

**BIOLOGISCHE- UND BIOCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG
VON SV40 T-ANTIGENEN MIT MUTATIONEN
IN DEN PHOSPHORYLIERTEN DOMÄNEN**

JENS SCHNEIDER

1986



Digitized by the Internet Archive
in 2026

**BIOLOGISCHE- UND BIOCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG
VON SV40 T-ANTIGENEN MIT MUTATIONEN
IN DEN PHOSPHORYLIERTEN DOMÄNEN**

**Dissertation der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der
Ludwig-Maximilians-Universität, München**

**vorgelegt
von
Jens Schneider**

**am
24. Mai 1986**

Tag der mündlichen Prüfung: 30.7.1986

1. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Fanning-Honegger

2. Berichterstatter: Prof. Dr. E.L. Winnacker

meinen Eltern

Das tiefste und erhabenste Gefühl, dessen wir fähig sind, ist das Erlebnis des Mystischen. Aus ihm keimt alle Wissenschaft. Wem dieses Gefühl fremd ist, wer sich nicht mehr wundern und in Ehrfurcht verlieren kann, der ist bereits tot. Das Wissen darum, daß das Unerforschliche wirklich existiert und daß es sich als höchste Wahrheit und strahlendste Schönheit offenbart, wovon wir nur eine dumpfe Ahnung haben können - dieses Wissen und diese Ahnung sind der Kern aller wahren Religiosität. In diesem Sinne, und in diesem allein, zähle ich mich zu den echt religiösen Menschen.

(Albert Einstein)

Die vorliegende Arbeit wurde von Juli 1982 bis Februar 1986 auf Anregung und unter Leitung von Frau Prof Dr. E. Fanning am Institut für Biochemie der Ludwig-Maximilians-Universität München ausgeführt.

Frau Prof. Dr. E. Fanning danke ich besonders für die vielen weiterbringenden Diskussionen, die Unterstützung, die sie dieser Arbeit jeder Zeit zuteil werden ließ und für die mir gegebenen Möglichkeiten, an einigen Kongressen teilnehmen zu können.

Dr. R. Mertz und Sabine Stelzig bin ich zu besonderem Dank verpflichtet, da sie mir die Oligonukleotide zur Verfügung stellten, die den Grundstock meiner Arbeit bildeten.

Ursula Markau und Silke Dehde danke ich für die praktische Hilfe im Labor, Andrea Schmid sowohl für die Anfertigungen der vielen Photographien für die Doktorarbeit und die Vorträge, als auch einige praktische Hilfe im Labor. Dr. B. Jameson half mir durch viele aufbauende Diskussionen und die Anfertigung der Protein-Sekundärstrukturen.

Weiterhin gilt mein Dank allen Mitarbeitern meines Arbeitskreises, die mein Projekt durch praktische Zusammenarbeit und Diskussionen unterstützt haben.

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG

1.1. Das große Tumor-Antigen des Affenvirus 40	1
1.2. Aufgabenstellung	6

2. MATERIAL

2.1. Das Plasmid pSDL13-1.13	7
2.2. Für die Mutagenese verwendete Oligonukleotide	8
2.3. Die Plasmide pSV-WT und p1097	11
2.4. Zelllinien und Virus	11
2.5. Medien	11
2.6. Antikörper	12
2.7. Enzyme	12
2.8. Chemikalien und andere Materialien	12

3. METHODEN

3.1. Reinigung der Oligonukleotide	15
3.2. Konzentrationsbestimmung der Oligonukleotide	17
3.3. Herstellung von einzelsträngiger Plasmid DNA	18
3.4. 5'-Phosphorylierung der Oligonukleotide	19
3.5. Oligonukleotid gesteuerte Mutagenese	20
3.6. Kolonie-Hybridisierung	23
3.7. Charakterisierung der Mutanten	25
3.8. DNA Transfektion	25
3.9. Plaque Test	26
3.10. Transformation von Rattenzellen	27
3.11. DNA Bindung	28
3.12. Größenbestimmung der T-Antigen Mutanten	29
3.13. Immunfluoreszenz und Immunperoxidase Färbung	29

4. ERGEBNISSE

4.1. Oligonukleotid gesteuerte Mutagenese	32
4.2. Verifizierung der eingeführten Mutationen	37
4.3. DNA Replikation	45

4.4.	Plaque Test	48
4.5.	Marker Rescue	50
4.6.	Transformation von Rattenzellen	50
4.7.	Expression der T-Antigen Mutanten	58
4.8.	DNA Bindung	58
4.9.	Subzelluläre Lokalisierung	63
5.	DISKUSSION	
5.1.	T-Antigene mit Mutationen in den phosphorylierten Domänen	76
5.2.	Biologische- und biochemische Charakterisierung	79
6.	ZUSAMMENFASSUNG	88
7.	ANHANG	
7.1.	Computervoraussagen zur Sekundärstruktur der T-Antigen Mutanten	89
8.	LITERATURVERZEICHNIS	97

Verzeichnis der Tabellen

1. Eingeführte Restriktionsenzym Erkennungsstellen	10
2. Mutanten-Ausbeute	36
3. Plaque Test	49
4. Transformation von rat2 Zellen	57
5. Zusammenfassung der Phänotypen der Mutanten	75

Verzeichnis der Abbildungen

1. Funktionale Karte des großen SV40 T-Antigens	5
2. Das Plasmid pSDL13-1.1.3	8
3. Reinigung von Oligonukleotiden	16
4. Mutagenese Reaktionsschema	22
5. Reinigung mutagenisierter DNA und Koloniehybridisierung	24
6. Aminosäuresubstitutionen	33
7. Verifizierung der eingeführten Mutationen	38
8. Sequenzgele (SV106, 111/112, 120, 123)	40
9. Sequenzgele (SV124, 124E, 676P1)	41
10. Sequenzgele (SV676, 677, 679, 701)	42
11. Sequenzgele (SV124D, 124S)	43
12. Sequenz der Duplikationen von SV124D und SV124S	44
13. DNA Replikation in TC7 Zellen	46
14. Replikationskinetik der Mutante SV679	47
15. Replikation in COS Zellen	47
16. DNA Replikation der Marker Rescue Mutanten	51
17. Transformation von rat2 Zellen (1)	53
18. Transformation von rat2 Zellen (2)	54
19. Mikroskopischer Vergleich transformierter und nicht transformierter rat2 Linien	55
20. Wachstum einer transformierten rat2 Linie in Weichagar	56
21. Größenbestimmung der T-Antigen Mutanten	59
22. DNA Bindung (1)	61
23. DNA Bindung (2)	62

IV

24. Subzelluläre Lokalisierung (T-Antigen/VP1; WT, SV676, 677)	65
25. Subzelluläre Lokalisierung (T-Antigen; WT, SV40(cT)-3, SV676)	67
26. Subzelluläre Lokalisierung (T-Antigen/Fiber)	70
27. Subzelluläre Lokalisierung (T-Antigen/DNA)	73
28. Modell für die Entstehung der Duplikationen bei SV124D und SV124S	78

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Abb.	Abbildung
A _x	Absorption bei der Wellenlänge x nm
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
Ci	Curie (1 Ci = 3,7 x 10 ¹⁰ Becquerel)
cpm	gezählte Zerfälle pro Minute
DME	Dulbecco modified Eagle's Medium
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylen-dinitrilo-tetraessigsäure
g/l	Gramm pro Liter
h	Stunde
kD	Kilodalton
mA	Milliampere
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	millimolar
nm	Nanometer
ng	Nanogramm
NP-40	Nonidet P-40
Pfu	Plaque forming units
RNase	Ribonuklease
SDS	Natriumdodecylsulfat
SV 40	Simian Virus 40
T-Antigen	großes Tumor-Antigen
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl pH 8,0/ 1 mM EDTA-Puffer
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit, Einheit
ug	Mikrogramm
ul	Mikroliter
uM	mikromolar
WT	Wildtyp

1. Einleitung

1.1 Das große Tumor-Antigen des Affenvirus 40

(Übersichtsartikel: Tooze, 1981; Rigby und Lane, 1983)

Das Affenvirus 40 (SV40) ist ein viel verwendetes Untersuchungsobjekt der Molekularbiologen zu genetischen Prozessen in Eukaryonten. Es gehört zur Klasse der Papovaviren, die ihre Erbinformation in Form von DNA speichern. Das Genom des SV40 Virus besteht aus 5243 ringförmig angeordneten Basenpaaren, deren Reihenfolge bekannt ist. Das Genom wird vom Replikationsursprungsort aus gesehen in zwei Teile unterteilt, die frühe und späte Region. Die frühe Region enthält das Gen für das sogenannte kleine und große Tumorantigen, die späte Region kodiert für die Virushüllproteine VP1, VP2 und VP3. Die Transkription der Gene verläuft bidirektional, ausgehend vom Replikationsursprungsort. SV40 kann sich in permissiven Affenzellen lytisch vermehren. Etwa 10-12 Stunden nach Infektion können die frühen Transkriptionsprodukte nachgewiesen werden, das kleine und große Tumorantigen. Die virale DNA Replikation beginnt etwa 12-15 Stunden nach Infektion. Ebenso wird die Replikation zellulärer DNA stimuliert. Anschließend werden die Virushüllproteine hergestellt. Nach etwa 25 Stunden können infektiöse Viruspartikel nachgewiesen werden, die in der Zelle akkumulieren und diese nach etwa 60-70 Stunden lysieren.

Für SV40 nicht permissive Zellen, z.B. Nagetierzellen, überleben eine virale Infektion. Es werden keine Viruspartikel freigesetzt, weil sich die Virus DNA in diesen Zellen nicht vermehren kann. Die Stimulation der späten Transkription ist blockiert, wozu wahrscheinlich wirtszellspezifische Faktoren benötigt werden. Nicht permissive Zellen können durch SV40 transformiert werden. Transformierte Zellen lassen sich von nicht transformierten

durch ihre Wachstumseigenschaften unterscheiden. Die transformierten Zellen sind in der Lage, in restriktivem, wenig Serum enthaltenden Medium zu wachsen. Sie können in einer Kulturschale mehrschichtig, aber auch in Weichagar wachsen. In diesen Zellen ist das T-Antigen Gen in das Wirtszellgenom integriert. Sie exprimieren permanent das große T-Antigen, welches für die Aufrechterhaltung des Transformationsstatus verantwortlich ist. T-Antigen ist in transformierten und nicht transformierten Zellen hauptsächlich im Kern lokalisiert (Pope und Rowe, 1964). Eine kleine Fraktion ist in die Plasmamembran integriert (Deppert et al., 1981). In transformierten Zellen spielt sie wahrscheinlich eine Rolle bei der Induktion und Aufrechterhaltung der Transformation. Außerdem ist das T-Antigen mit dem zellulären Phosphoprotein p53 assoziiert, wobei noch nicht vollständig geklärt ist, ob diese Assoziation für die Transformation von essentieller Bedeutung ist. Das kleine T-Antigen ist nicht essentiell, wirkt aber unterstützend auf die Transformationseigenschaften des großen T-Antigens (Sleigh et al., 1978).

Das T-Antigen ist ein multifunktionales Protein, es reguliert sowohl das Virus betreffende- als auch wirtszellspezifische Regulationsvorgänge. Außer den bisher genannten Eigenschaften wie Transformation und Bindung an das zelluläre Protein p53 ist es z.B. in der Lage, ATP und dATP zu spalten, Nukleotide zu binden und Transkription von ribosomaler DNA zu aktivieren. Die verschiedenen Funktionen können bestimmten Domänen des Proteins zugeordnet werden (Abb.1). T-Antigen bindet an genau definierte Nukleotidsequenzen im Bereich des Replikationsursprungsortes (Bindungsstellen I und II; Tegtmeyer, 1972; Reed et al., 1975; Tjian et al., 1978). Durch die Bindung an den Replikationsursprungsort reguliert das T-Antigen die DNA Replikation (Shortle et al., 1979; DiMaio und Nathans, 1980) und die Transkription seines eigenen Gens (Autoregulation),

was durch Arbeiten von DiMaio und Nathans (1982) gezeigt wurde. Ebenso stimuliert T-Antigen die Expression der späten Gene (Brady et al., 1984; Brady und Khoury, 1985).

Nach seiner Synthese an den Ribosomen wird das T-Antigen chemisch modifiziert. Diese posttranslationale Modifizierung beinhaltet u.a. Glykosylierung, Fettsäure-Acylierung und Phosphorylierung. Viele dieser Eigenschaften werden in dieser Arbeit besprochen. Darüber hinaus sei auf die oben zitierten Übersichtsartikel hingewiesen.

Ziel dieser Arbeit war es, die Phosphorylierung des T-Antigens genauer zu untersuchen. Es wird angenommen, daß Protein-Phosphorylierung eine wichtige regulatorische Funktion in einem breiten Spektrum von Systemen hat. Es gibt einen Zusammenhang zwischen Phosphorylierung bestimmter Histone und Chromatin-Kondensierung (Rubin und Rosen, 1975). Außerdem ist die Protein-Phosphorylierung in der neuronalen und hormonalen Kontrolle von zellulären Aktivitäten involviert (Cohen, 1982). Miake-Lye und Kirschner (1985) zeigten, daß zu Beginn der Mitose die Kern Lamina phosphoryliert werden. Es sind spezialisierte Proteine, die Poren in der Kernmembran formen. Mit der Konstituierung des Zellkerns zum Ende der Mitosephase werden die Kern Lamina dephosphoryliert (Burke und Gerace, 1986). Phosphorylierung der Kern Lamina ist also wahrscheinlich zumindest ein Faktor bei der Zellteilungskontrolle.

Das T-Antigen betreffend, gab es Evidenzen, daß die Phosphorylierung in Zusammenhang mit der Regulation seiner eigenen Funktion steht. Dafür sprach, daß die mit dem Protein assoziierten Phosphatgruppen häufiger erneuert werden als das Protein selbst (Edwards et al., 1979). Das T-Antigen ist an mindestens acht Serin- und Threoninresten phosphoryliert (Scheidtmann et al., 1982). T-Antigen bildet Oligomere, die ein unterschiedliches Phosphorylierungsmuster und DNA Bindungsverhalten zeigen (Fanning et al., 1981, 1982; Scheidtmann et al., 1984a). Es gibt eine N- und

C-terminale Phosphorylierungsdomäne (Abb. 1). Diese beiden Domänen sind in Bereichen des Proteins lokalisiert, die bestimmten Funktionen zugeordnet werden. Die N-terminale Phosphorylierungsdomäne ist der Domäne sehr nahe, oder überlappt sie sogar, die spezifisch an den SV40 DNA Replikationsursprungsort bindet. Clark et al. (1983) grenzten den Bereich, der an der DNA Bindung beteiligt ist, auf die Aminosäureposition 83 bis 400 ein. Andere Arbeitsgruppen unternahmen den Versuch, genauere Aussagen über diese DNA bindende Domäne zu treffen. Hier gibt es einen Widerspruch zwischen Morrison et al. (1983) und anderen Gruppen. Morrison et al. stellten ein tryptisches, aus den ersten 130 N-terminalen Aminosäuren bestehendes T-Antigen Fragment her, daß spezifisch ein den SV40 Replikationsursprungsort enthaltendes DNA Fragment bindet. Dem widersprechen die Arbeiten von Clark et al. (1983), Paucha et al. (1986) und Simmons (1986). Die Arbeit von Simmons enthält sehr überzeugende Evidenzen, daß die 130 N-terminalen Aminosäuren nicht die Protein Bindungsdomäne enthalten. Er isolierte ein sich von Lysin131 bis Lysin371 erstreckendes tryptisches Fragment, daß spezifisch SV40 DNA bindet. Paucha et al. (1986) zeigten, daß Mutationen im Bereich der Aminosäuren 147 bis 166 sich besonders drastisch auf das DNA Bindungsverhalten auswirken, während von dieser Position dem N-Terminus zugewandte Mutationen das Bindungsverhalten nicht beeinflussen. Ihre Daten unterstützen die Vorstellung, daß die Bindungsstelle I und II von ein und derselben Domäne des T-Antigens erkannt wird. Aus diesen Beobachtungen läßt sich schließen, daß die N-terminale Phosphorylierungsdomäne der Bindungsdomäne zumindest sehr nahe ist. Das C-terminale Ende des Proteins ist in der Stimulation der späten Proteinsynthese involviert. Mutanten, die diese Domäne des Proteins betreffen sind meist replikationspositiv, können aber keine Viruspartikel mehr ausbilden (Cole et al., 1979; Tornow et al., 1985; Pipas, 1985).

TENTATIVE FUNCTIONAL MAP OF SV40 T-ANTIGEN

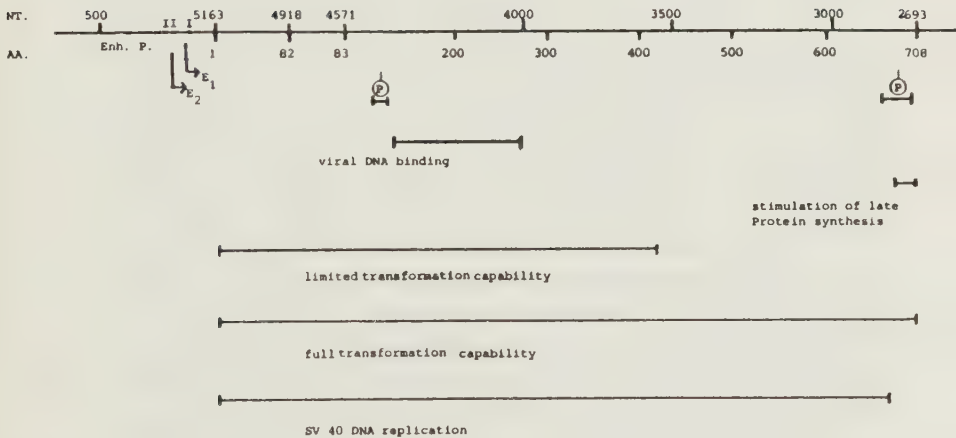


Abb. 1: Vorläufige funktionale Karte des groBen SV40 T-Antigens

Dargestellt ist der Teil des SV40 Genoms, der für das T-Antigen kodiert, der Replikationsursprungsbereich mit den Bindungsstellen I, II und die beiden Transkriptionsstartstellen E₁ und E₂. Die obere Zahlenreihe gibt die Nukleotidnummern wieder, die untere die dazugehörigen Aminosäuren des T-Antigens. Die Balken grenzen die Aminosäurebereiche ein, die für die beschriebenen Funktionen notwendig sind. Ebenso ist die Lokalisierung der N- und C-terminalen Phosphorylierungsdomäne (P) gezeigt.

1.2. Aufgabenstellung

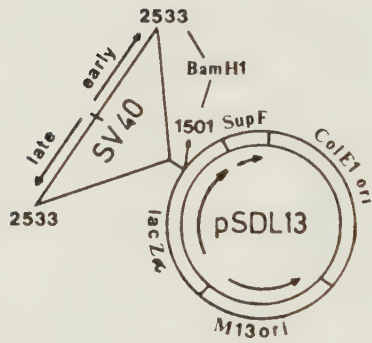
Über die genaue Funktion der Phosphorylierungsdomänen des T-Antigens ist bis jetzt nichts bekannt. Diese beiden Domänen repräsentieren stark hydrophile Bereiche und sollten sich daher an der Oberfläche des Proteins befinden. Die positionelle Nähe zu den vorher beschriebenen Domänen des T-Antigens (Abb. 1) und die Frage, ob Phosphorylierung eventuell auch mit anderen Funktionen des T-Antigens, wie z.B. Transformation und subzellulärer Lokalisierung, in Zusammenhang gebracht werden könnte, begründete das Vorhaben dieser Arbeit, die Phosphorylierung des T-Antigens genauer zu untersuchen. Um diese Frage zu klären, sollten T-Antigene mit Mutationen in den phosphorylierten Domänen erzeugt werden. Zu Erzeugung dieser Mutanten sollte die Methode der Oligonukleotid gesteuerten Mutagenese benutzt werden, mit der es möglich ist, gezielt das Genom des SV40 Virus so zu verändern, daß dieses nun für ein mutiertes T-Antigen kodiert (Zoller und Smith, 1982). Mit Hilfe dieser Methode sollten sukzessive alle phosphorylierten- durch nicht phosphorylierbare Aminosäuren ersetzt werden. Die auf diese Weise kreierte T-Antigen Mutanten sollten auf ihre biologischen- und biochemischen Eigenschaften untersucht werden, um eventuell Rückschlüsse auf die Funktion der Phosphorylierungsdomänen ziehen zu können.

2. Material

2.1. Das Plasmid pSDL13-1.13

Dieses Konstrukt (Abb. 2) besteht aus dem kleinen Plasmid pSDL13 (Levinson et al., 1984), in dessen einzige BamHI-Schnittstelle an Position 1501 das gesamte SV40-Genom aus pSV-WT (Fanning et al., 1982) kloniert wurde (Geschenk C.Fischer, Universität München).

Der Vektor pSDL13 ist ein Derivat des Miniplasmids Φ VX (B.Seed, 1983), das zusätzlich den Replikationsursprungsort (ori) des Einzelstrang-DNA-Phagen M13 und die lacZ-alpha-Sequenz aus dem Plasmid pUC8 enthält. pSDL13 wird in dem Bakterienstamm FP3p3 gezüchtet. Dieser Stamm wurde durch den sequentiellen Transfer des F'-Faktors aus JM103 (F' lacI^q lacZ Δ M15 proAb traD36) und des p3-Plasmids (Rp1 bla(am) tet(am) tra) in den Stamm NK5449 (Δ lac proXIII gyrA thi rpoB argE, von N.Kleckner) hergestellt. Das Plasmid p3 ist Ampizillin und Tetrazyklin sensitiv, aber Kanamycin resistent. Durch das supF-Gen in pSDL13 ist der diesen Vektor enthaltende Stamm FP3p3 resistent gegen alle drei Antibiotika. pSDL13 komplementiert durch seine lacZ-alpha-Region die lacZ-M15-Deletion des Stamms. Durch diese Komplementation kann eine enzymatisch aktive beta-Galaktosidase produziert werden, was sich in Gegenwart von 5-Brom-4-Chlor-3-Indoyl- β -D-Galactosid (X-Gal) nachweisen läßt. Durch Klonieren eines Gens in den Polylinker des Vektors verliert dieser seine Komplementationseigenschaft. In der Praxis bildet der Vektor alleine auf Agar-Platten in Gegenwart von X-Gal den blauen Farbstoff 5-Brom-4-Chlor-Indigo. Enthält pSDL13 ein Insert im lacZ-Gen, kann X-Gal nicht mehr hydrolysiert werden und es entstehen weiße Kolonien. Diese Erscheinung erlaubt es Vektoren, die ein bestimmtes Insert enthalten, von reinen Vektoren zu unterscheiden.



pSDL13-1.13

Abb. 2: Das Plasmid pSDL13-1.13

2.2. Für die Mutagenese verwendete Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von Dr. R. Mertz (Genzentrum München) synthetisiert. Dieses geschah mit Hilfe der Phosphittriestер-Methode (Dörper et al., 1982, 1983). Der Name des Oligonukleotids zeigt die Aminosäure des T-Antigens an, die ausgetauscht werden sollte (Abb. 6). Die Punkte über den Nukleotiden kennzeichnen die beabsichtigten Mutationen gegenüber Wildtyp. Die Pfeile kennzeichnen die Spaltstelle einer neu geschaffenen Restriktionsenzym-Erkennungsstelle (s. Tabelle 1, Seite 10). 124DE stellt ein Gemisch aus zwei Oligonukleotiden dar, die entweder an der Position 124 für eine Asparaginsäure (D) oder Glutaminsäure (E) kodieren. MRWT wurde für das Marker Rescue Experiment benutzt. Die Oligonukleotide P1 und P2 dienten als Starter zur Sequenzierung der Muntanten.

Name	5'----> 3'	td ¹	ε _{ber} ²
106	CTGTTTTCGCGAGAAGAA ↓	52	208.7
111/112	AATGCCAGCTGTGATGATG ↓	58	230.8
120	CTGCTGACGCGCAACATTC ↓	60	201.0
123-1	TCCACATGCTACTCCTC	50	158.8
123-2	TCTCCACATGCTACTCCTCCA	62	206.4
124	CTCAACATTCCGCTCCTCC ↓	60	176.5
124DE	CTCAACATTCCGGA(T/Ä)CCTCCAAAAAAG ↓	74	300.1
124S	CAACATTGAGTCTCCTCAA ↓	56	204.3
639	GATGAAGACGCGCAGGAAAAAT ↓	62	269.3
676	CCCTCAAGCTTCACAGTCT ↓	62	197.6
677	CTCAGTCAAGCTCAGTCTGTTC ↓	60	212.4
679	CCTCACAAGCTGTTCATGA ↓	56	203.9
701	AACCTCCCGGCTCTCC ↓	60	148.6
MRWT	CTGCTGACTCTCAACATTCTACTCCTCAA	86	292.6
P1	GATGAATGGGAGCAGTG	52	216.8
P2	GAAACAGGCATTGAT	42	167.9

1) berechnete Schmelztemperatur in °C (A/T=2°C; G/C=4°C)

2) berechneter millimolarer Extinktionskoeffizient bei 260nm (S. Methoden S. 17).

MUTANT	NEW RESTRICTION SITE/ NUCLEOTIDE NO.	WT FRAGMENT/ MUTANT FRAGMENTS
SV106	HhaI / 4502	3274 / ¹⁰⁸⁴ 2190
SV111/112	AluI / 4486	329 / ¹⁵⁷ 172
SV120	HhaI / 4460	3274 / ¹¹²⁶ 2148
SV123	—	—
SV124	—	—
SV124D	BamHI / 4449	5243 / ¹⁹¹⁶ 3327
SV124E	—	—
SV124S	TaqI / 4448	2227 / ²⁹⁰ 1937
SV639	HhaI / 2903	3274 / ⁵⁸⁹ 2685
SV676	AluI / 2791	775 / ¹⁴⁰ 635
SV677	AluI / 2788	775 / ¹³⁷ 638
SV679	AluI / 2782	775 / ¹³¹ 644
SV701	HhaI / 2715	3274 / ⁴⁰³ 2871

Tabelle 1: Eingeführte Restriktionsenzym Erkennungsstellen

Die mit der Mutation neu eingeführte Restriktionsenzym Erkennungsstelle mit der entsprechenden Position im SV40 Genom wird dargestellt. Die dritte Spalte gibt die Größe der dadurch entstehenden Restriktionsfragmente gegenüber WT an.

2.3. Die Plasmide pSV-WT und p1097

Die beiden Plasmide wurden für die DNA Bindungsexperimente benutzt. pSV-WT (Fanning et al., 1982) enthält das gesamte SV40 Genom, das in die einzige BamHI Schnittstelle des Vektorplasmids pAT (Twigg und Sherratt, 1980) kloniert wurde. p1097 besteht aus der SV40 Deletionsmutante csl097 (DiMaio und Nathans, 1982), in der die gesamte Bindungsstelle I des SV40 Replikationsursprungsortes deletiert ist und ebenfalls dem Vektor pAT, in den die Mutante in die BamHI Schnittstelle kloniert wurde, jedoch in umgekehrter Orientierung (Huber et al., 1985).

2.4. Zelllinien und Virus

Es wurden folgende Zelllinien verwendet:

Für die DNA Replikationsexperimente wurden für SV40 permissive TC7 Affennierenzellen (Robb und Huebner, 1973) und die Linie COS1 (Gluzman, 1981) benutzt. Diese Linie ist eine mit einer Replikationsursprungsort defekten SV40 Mutante transformierte CV1 Affennieren Zelllinie.

Für die Transformationsexperimente wurde die für SV40 nicht permissive Ratten-Fibroblasten Zelllinie rat2 (Topp, 1981) benutzt.

Der Adenovirus Typ2 wurde mir von T. Dörper, Universität München freundlicherweise zur Verfügung gestellt (Quelle: Zellüberstand aus sonifizierten virusinfizierten HELA Zellen).

2.5. Medien

Die Zellkulturen wurden in Dulbecco's modified Eagle Medium (DME von Gibco) bei 37°C und 5% CO₂ in Brutschränken (Forma Scientific) gezüchtet. TC7 und rat2 Zellen wurden in DME/8% Newborn Calf Serum und COS1 in DME/5% Fetal Calf Serum gezüchtet. Zusätzlich enthielten beide Medien 40mg/l Penizillin, 80mg/l Streptomycin, 100mg/l Kanamycin und 3,9g/l NaHCO₃.

Die Aufzucht der Bakterien erfolgte LB-Medium (10g/l Trypton, 10g/l Hefeextrakt, 5g/l NaCl, pH 7.7). pSDL13-1.13 wurde in Gegenwart von 12.5ug/ml Ampizillin/7.5ug/ml Tetrazyklin, der Bakterienstamm FP3p3 in Gegenwart von 50ug/ml Kanamyzin aufgezogen.

2.6. Antikörper

Mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) und Meerettich-Peroxidase gekoppelte Tier Anti-Maus- und Tier Anti-Kanninchen Antikörper stammten von der Firma Dakopatts. Mit Texas Red gekoppelte Tier Anti-Kanninchen Antikörper von der Firma Amersham und Buchler. Der monoklonale Antikörper Pab597 IgG (E. Harlow, pers. Mitteilung) wurde über Protein-A Sepharose gereinigt (Huber et al., 1985). Pab 416, 419 IgG (Harlow et al., 1981) und Pab108 IgG (Gurney et al., 1986) wurden von B. Vogt und S. Dehde, Universität München, gereinigt und zur Verfügung gestellt.

2.7. Enzyme

Die verwendeten Restriktionsenzyme stammten von den Firmen Biolabs und Renner, die für die Mutagenese Reaktion verwendeten Klenow Polymerasen von den Firmen Biolabs, Stehelin und Pharmacia (Tabelle 2). Die Sequenzierung erfolgte ausschließlich mit einer HPLC gereinigten Klenow Polymerase von Pharmacia. Die Polynukleotid Kinase (PNK) stammte von Biolabs.

2.8. Chemikalien und andere Materialien

Firma Amersham und Buchler, Braunschweig

γ - ^{32}P -ATP (3000 Ci/mmol), α - ^{35}S -thiodATP (650 Ci/mmol), L- ^{35}S -Methionin (800Ci/mmol).

Firma Biochrom KG, Berlin

Fötale Kälberserum, Serum neugeborener Kälber.

Firma Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA

Bacto-Agar, Hefe-Extrakt, Trypton.

Firma Gibco Europe GmbH, Karlsruhe

DME, Fötale Kälberserum, Serum neugeborener Kälber.

Firma Kodak Limited

Röntgenfilme X-Omat S und XAR-5.

Firma E. Merck AG, Darmstadt

Borsäure, Kalziumchlorid, Chloroform, Diethylether,
Dinatriumhydrogenphosphat

Ethylen-dinitrilo-tetraessigsäure-Dinatriumsalz (EDTA),
Ethanol p.A., Essigsäure p.A., Glucose, Glycerol, Glycin,
Kaliumchlorid, Kaliumdihydrogenphosphat, Kaliumacetat,
Lithiumchlorid, Magnesiumchlorid, Magnesiumsulfat,
2-Mercaptoethanol, Natriumacetat, Natriumazid,
Natriumcarbonat, Natriumdodecylhydrogensulfat (SDS),
Natriumchlorid, Natriumdihydrogenphosphat,
Natriumhydrogencarbonat, Natriumhydroxid,
Natriummetaperjodat, Natriumtetraborat, Nickelchlorid,
Perhydrol 30%, Phenol, Phosphorsäure 85%, Salzsäure 25%,
Sucrose, Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris),
Zinkchlorid.

Firma Nunc GmbH, Wiesbaden

Gewebekulturschalen

Firma Serva, Heidelberg

Acrylamid, Ammoniumperoxodisulfat, Ampicillin,
Bromphenolblau, Kanamycin, Lysozym,
N,N'-bis-methyl-acrylamid, Penicillin, Streptomycin,
N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylen-diamin, Trypsin, Triton X-100.

Firma_Sigma

Adenosin-5'-triphosphat (ATP), Cytosin-5'-triphosphat (CTP),
2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat (dATP),
2'-Desoxycytosin-5'-triphosphat (dCTP),
2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat (dGTP), Dithiothreitol
(DTT), N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
(Hepes), Nonidet P-40, Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF),
Piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfon-säure) (PIPES),
Ribonuklease-A vom Rinderpankreas, Rinderserumalbumin,
Spermidin, Triethanolamin, Thymidin-5'-triphosphat (TTP).

3. Methoden

3.1. Reinigung der Oligonukleotide

Samtliche Oligonukleotide wurden durch Gelelektrophorese in denaturierenden Harnstoff-Polyacrylamidgelen (Sequenzgele) gereinigt.

Das Lyophilisat wurde in 200ul TE aufgenommen und davon 20ul auf ein 12% Polyacrylamid-8M Harnstoffgel aufgetragen. Vor dem Auftragen wurde das gelöste Oligonukleotid mit 10ul Farbmärker versetzt und in eine gut ausgespulte Tasche von 0.5mm Geldicke und 20mm Spurbreite gegeben. Die Elektrophorese wurde bei 15V/cm 3h ausgeführt. Die Auftrennung kann anhand der Farbmärker abgeschätzt werden. Alle Oligonukleotide der Länge 10-30mer wandern bei dieser Gelkonzentration zwischen den Märkern Bromphenolblau und Xylencyanol.

Das aufgetrennte Oligonukleotidgemisch muß nun sichtbar gemacht werden, um die am langsamsten wandernde Bande, die das gewünschte Produkt repräsentiert, aus dem Gel herauszuschneiden und eluieren zu können. Eine Anfärbung der DNA mit Ethidiumbromid ist nicht möglich, da ihre Konzentration zu gering ist. Das Oligonukleotid wird daher durch UV-Fluoreszenzloschung sichtbar gemacht, indem das Gel auf eine Plastikfolie gebracht und auf eine Kieselgel-Dünnschichtchromatographie-Platte gelegt wird. Die DC-Platte (Merck Kieselgel 60F 254) ist mit einem bei 254nm absorbierenden Fluoreszenzfarbstoff beschichtet. Das Gel wird nun von oben mit UV-Licht der Wellenlänge 254nm bestrahlt, wobei dunkle Banden im Gel sichtbar werden. Die Banden stellen das aufgetrennte Oligonukleotidgemisch dar (Abb. 3).

Die höchste gut sichtbare Bande wurde mit einem Skalpell exakt aus dem Gel getrennt, fein zerkleinert, in ein Eppendorfgefäß gebracht, mit dem zweifachen Gelvolumen TE überschichtet und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Durch 5

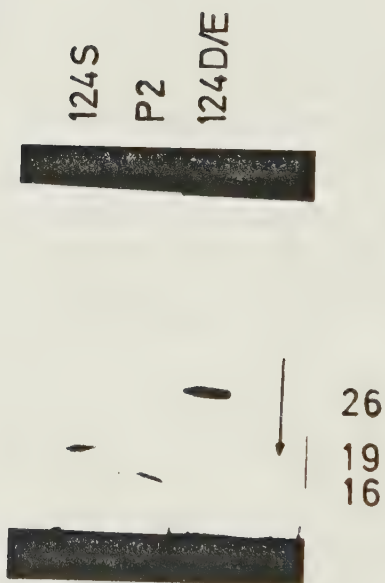


Abb. 3: Reinigung von Oligonukleotiden

Die drei Oligonukleotide 124DE, 124S und P2 wurden in einem 12%igen Polyacrylamid/8M Harnstoff Gel aufgetrennt. In allen drei Fällen verlief die Synthese sehr gut, da ausschließlich Hauptprodukt und kein (n-1)mer zu erkennen ist.

minütige Zentrifugation in einer Eppendorf-Tischzentrifuge und anschließenden Dekantierens des Überstandes wurde das in TE gelöste Oligonukleotid von Gelpartikeln getrennt. Es wurde darauf geachtet, daß sich keine Gelstücke mehr in der Lösung befanden. Diese wurde auf eine Endkonzentration von 0.3M Natriumacetat und 10mM Magnesiumchlorid eingestellt, mit 3Vol. 95% Äthanol versetzt und über Nacht bei -20°C aufbewahrt. Daraufhin wurde die DNA bei 4°C mit 19000U/min 20min zentrifugiert (Sorvall SS34-Rotor mit entsprechendem Adapter). Direkt nach Beendigung des Zentrifugierens wurde der Überstand abgekippt und das Eppendorfgefäß mit der Öffnung fest auf ein Papiertuch gedrückt, um den Überstand möglichst quantitativ zu entfernen. Das Sediment wurde in 300ul TE, 0.3M Natriumacetat gelöst und wie beschrieben noch einmal präzipitiert. Das sogereinigte Oligonukleotid war jetzt frei von Harnstoff und Gelpartikeln. Nach Lösen in 500ul TE konnte die Konzentration durch Messen der Absorption bei 260nm bestimmt werden.

3.2. Konzentrationsbestimmung der Oligonukleotide

Für ein bestimmtes Oligonukleotid wird der Extinktionskoeffizient bei 260nm aus der Summe der enthaltenen Nukleotide berechnet (ϵ_{ber}). ϵ_{260} beträgt für jedes einzelne Nukleotid:

$$T = 8.8 \quad dC = 7.4 \quad dG = 11.8 \quad dA = 15.0 \text{ ml/uMolcm}$$

Beispiel: die Extinktion des in 500ul TE gelösten Oligonukleotids 106 wird bei 260nm gemessen. Der Meßwert beträgt 0.21. Der berechnete mikromolare Extinktionkoeffizient für 260nm beträgt 208.7. Das Oligonukleotid liegt nun in einer Konzentration von $0.21/208.7 = 1.0\text{nMol/ml}$ vor.

3.3 Herstellung von einzelsträngiger Plasmid-DNA (SS-DNA)

30ml steriles, Antibiotika enthaltendes, L-Broth Medium (25ug/ml Ampizillin, 12.5ug/ml Tetrazyklin) wurde mit 300ul der pSDL13-1.13 (s.Material) enthaltenden FP3p3-Bakterien Übernachtskultur angeimpft und ca. 2h bei 37°C in einer Schüttelapparatur inkubiert. Bei einer optischen Dichte (Filter 585nm) von 0.3-0.4 wurde die Bakterienkultur mit 20ul M13 Wildtyp Phagenlösung versetzt und weitere 7-8h bei 37°C geschüttelt (Dente et al., 1983). Das entsprach einer Multiplizität der Infektion (m.o.i.) von etwa 50. Durch zweimalige Zentrifugation werden die Bakterien möglichst quantitativ vom Überstand entfernt (Rotor SS34, 8000g). Im Überstand befindet sich die einzelsträngige, als Phagen verpackte Plasmid- und M13 DNA. Durch Zugabe von 1/4Vol. 20%Polyethylenglykol 6000/2.5MNaCl zum Überstand wurde die DNA 15min bei 4°C präzipitiert und 5min bei 4000g zentrifugiert. Der weiße Niederschlag wird in 4ml TE gelöst und zweimal 15min mit Phenol/Chloroform vorsichtig bewegt. Anschließend wurde die wässrige Phase zweimal mit 8ml TE gesättigtem Diäthyläther extrahiert und zweimal äthanolgefällt. Es empfiehlt sich, die gereinigte Einzelstrang DNA in 4.5ml TE zu lösen, jeweils 400ul auf 10 verschiedene Eppendorfgefäße zu verteilen, die DNA noch einmal mit Äthanol zu präzipitieren und das trockene Sediment bei -20°C aufzubewahren. Einzelstrang DNA kann in gelöstem Zustand ungefähr 14Tage benutzt werden, ohne daß ein nennenswerter Anteil von unbrauchbarer gebrochener linearer DNA vorliegt. Einzelstrangbrüche lassen sich auf einem 0.8% Agarose-Gel leicht erkennen, da Einzelstrang DNA eine größere Mobilität als kovalent geschlossene zirkuläre SS-DNA zeigt. Die übrig gebliebenen 500ul gelöster DNA wurden zur Konzentrationsbestimmung verwendet. Diese wurde durch Messen der Absorption bei 260nm gegen den verwendeten Puffer bestimmt. $A_{260}=1$ entspricht 40ug SS-DNA/ml. Bei dem

beschriebenen Ansatz betrug die Gesamtausbeute etwa 50 μ g DNA.

3.4. Phosphorylierung der 5'-Hydroxylgruppe von Oligonukleotiden mit T4-Polynukleotidkinase

Die gereinigten Oligonukleotide besitzen eine freie 5'-Hydroxylgruppe und können somit direkt mit Hilfe der T4-Polynukleotidkinase (PNK) in Gegenwart von ATP oder gamma- 32 P ATP 5min phosphoryliert werden. 100pmol DNA wurden in 50mM TrisHCl pH9.5; 5mM Dithiothreitol; 5% Glycerin und 0.5mM ATP mit 5 Einheiten PNK nicht länger als 30min in einem Reaktionsvolumen von genau 10 μ l inkubiert. Auf eine vorsichtige aber gute Durchmischung der Komponenten mit einer Eppendorfpipette wurde geachtet. Die Reaktion wurde 10min bei 65°C gestoppt und das phosphorylierte Oligonukleotid bei -20°C aufbewahrt. Um das Oligonukleotid als Hybridisierungsprobe verwenden zu können, wurde die DNA mit gamma- 32 P-ATP 5min phosphoryliert. Dazu wurden 20uCi ATP (Amersham und Buchler, 3000Ci/mMol) verwendet. Die Versuchsbedingungen entsprechen exakt den oben beschriebenen. Nach Beendigung der Reaktion wird nicht eingebautes radioaktives ATP sofort über eine mit Sephadex G25 gefüllte Säule vom 5'- 32 P-Oligonukleotid abgetrennt. Als Säule diente eine 5ml Glaspipette mit einem Durchmesser von 0.5cm und 30cm Länge. Mit einem Fraktionssammler (Pharmacia Frac300) wurden 30 Fraktionen zu je 7 Tropfen entnommen (etwa 200 μ l pro Fraktion). Als Trennpuffer diente eine wässrige 50mM Na $_2$ HPO $_4$ Lösung. Das Ergebnis der Reaktion wurde mit einem Zählrohr beurteilt. Das Oligonukleotid wandert aufgrund seiner Größe schneller durch die Säule als nicht inkorporiertes ATP. Somit repräsentiert der erste der zwei beobachteten Peaks das gewünschte 5'- 32 P-Oligonukleotid. Im allgemeinen findet man unter diesen Bedingungen das erste radioaktive Material in der Fraktion 13-15 je nach Größe des Oligonukleotids. Die ersten

5 radioaktiven Fraktionen wurden vereinigt und konnten direkt als Hybridisierungsprobe eingesetzt werden. Die Anzahl der phosphorylierten Moleküle wurden mit Hilfe eines Szintillationszählers (Philips PW 4700) gemessen. 1 μ l der vereinigten Fraktionen werden mit 3ml Szintillationsflüssigkeit versetzt und die Anzahl der Zerfälle pro Minute (cpm) gemessen. Umgerechnet auf die Gesamtmenge gelöstes Oligonukleotids konnten durchschnittlich $1,5 \times 10^8$ cpm gemessen werden. Das bedeutet, daß etwa 26% des eingesetzten Substrates phosphoryliert wurden (T.G. Cooper, 1981). Die Ausbeute spielt für die Mutagenesereaktion eine große Rolle (siehe Seite 21, vgl. Zoller et al. (1982), 4×10^6 cpm/20pmol).

3.5. Oligonukleotid gesteuerte Mutagenese

Die gezielte Herstellung von SV40 Mutanten erfolgte im wesentlichen nach der Methode von Zoller und Smith (1982). 1pmol einzelsträngiger pSDL13-1.13 DNA wurde gut mit 5pmol 5'-phosphorylierten Oligonukleotid in einem Eppendorfgefäß vermischt in 0.2M TrisHCl pH7.5, 0.1M MgCl₂, 0.5M NaCl und 0.01M Dithiothreitol (Gesamtvolumen 10 μ l). Ein mit Wasser gefülltes 10ml Plastikröhrchen wurde im Wasserbad auf 60°C erhitzt und anschließend das Eppendorfgefäß in diesem Röhrchen 5min bei 60°C inkubiert. Das Röhrchen samt Eppendorfgefäß wurde nun 1h bei Raumtemperatur stehen gelassen ("Annealing"). Das spezifisch an die Einzelstrang-DNA gebundene Oligonukleotid diente als Starter ("Primer") für das Auffüllen des Einzelstrangs zu einer doppelsträngig kovalent geschlossen DNA (cc-Form). Dazu wurden 10 μ l einer Auffüllmischung (20mM TrisHCl pH8.8, 10mM MgCl₂, 10mM Dithiothreitol, 1mM dCTP, 1mM dGTP, 1mM TTP, 1mM ATP, 5 μ M alpha-³²P-dATP) mit 3 Einheiten E.coli Klenow Polymerase (im allgemeinen von Biolabs oder Pharmacia HPLC gereinigt) und 3 Einheiten T4 DNA-Ligase (Biolabs) gut mit der Annealing-Reaktion vermischt und 5min bei 23°C

inkubiert. 1ul 10mM dATP wurde hinzugegeben und 12h bei 15°C inkubiert. Anschließend wurde das sich im Kühlraum befindliche Wasserbad ausgeschaltet und die Probe ca. 5h auf 4°C abkühlen gelassen. Nach zweimaliger Ethanol-fällung wurde die DNA in 180ul TE gelöst und mit 20ul 2N NaOH versetzt. Die gesamte Probe wurde vorsichtig auf einen 5-20% alkalischen Sucrosegradienten (0.2M NaOH, 1M NaCl und 2mM EDTA) gegeben. Die Zentrifugation wurde 1h45min bei 4°C in einem SW55Ti-Rotor (Beckmann) bei 44000 UPM durchgeführt. Der Boden des Röhrchens wurde punktiert und ca. 30 Fraktionen zu 6 Tropfen entnommen, die mit 40ul 1M Tris/Zitrat pH4.5 neutralisiert wurden. Die Cerenkov-Strahlung aller Fraktionen wurde gemessen und alle Fraktionen, die schneller sedimentierende radioaktive DNA enthielten, vereinigt. Vollständig aufgefüllte Einzelstrang DNA, die anschließend durch Ligase zu einem kovalent geschlossenen doppelsträngigen Molekül verknüpft wurde, wandert schneller durch den alkalischen Gradienten als unvollständig aufgefüllte Moleküle, die denaturiert als zirkuläre und lineare Einzelstränge vorliegen. Eine Verknüpfung ist nur möglich, wenn das Oligonukleotid 5'-phosphoryliert vorliegt.

Die DNA wurde mit Äthanol präzipitiert, einmal mit 80% Äthanol gewaschen und in 50ul TE gelöst. 300ul kompetenter FP3p3-Bakterien wurden mit 5ul gelöster mutagenisierter DNA transformiert (Maniatis et al. (1982), S.150-151) und direkt auf Ampizillin und Tetrazyklin enthaltene LB-Platten ausgestrichen. Am folgenden Tag wurden etwa 200-400 Bakterienkolonien beobachtet, die zur Koloniehybridisierung verwendet wurden.

Die radioaktive Markierung der DNA sowie die Reinigung über einen alkalischen Sucrosegradienten dient als Kontrolle für eine vollständige Auffüllreaktion. Bei erfolgreich ausgetesteten Versuchsbedingungen kann dieser Schritt übergangen werden, wobei die Auffüllmischung nun 1mM ATP anstelle von 5uM alpha-³²P-dATP enthalten muß.

OLIGONUCLEOTIDE-DIRECTED MUTAGENESIS

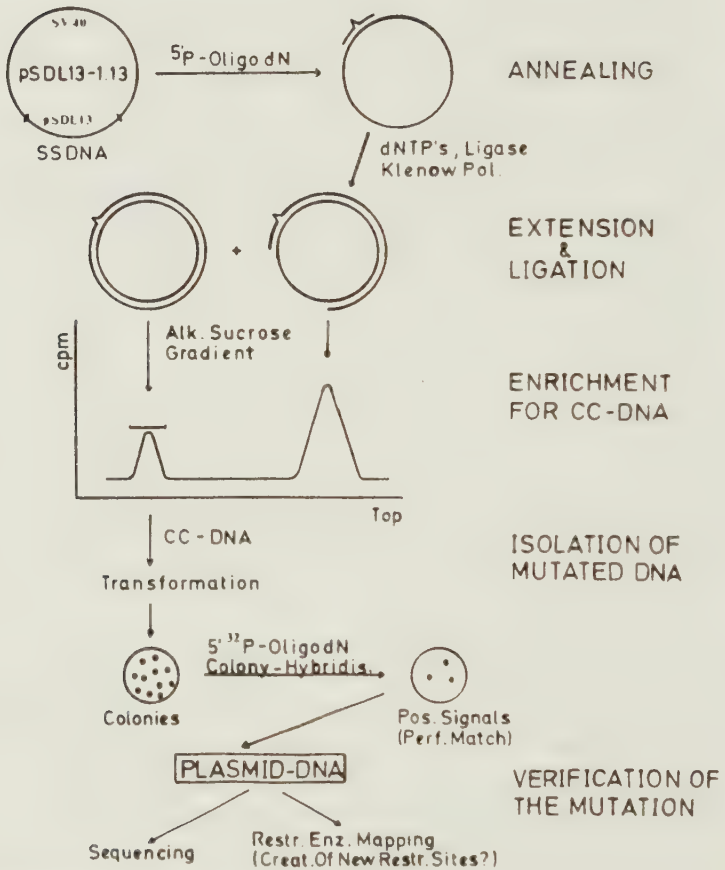


Abb. 4: Mutagenese Reaktionsschema

Diese Abbildung beschreibt schematisch die im Text beschriebene Mutagenese Reaktion.

Abb. 4 zeigt das Mutagenese-Schema, Abb. 5 das Ergebnis einer Mutagenese Reaktion und Koloniehybridisierung.

3.6. Kolonie-Hybridisierung

Mit dieser Methode kann man die Bakterienkolonien finden, die die gewünschte Mutation enthalten (Gergen et al., 1979). Dabei wurden die durch die Mutagenese Reaktion erhaltenen Klone in einem Raster (ca. 100 Klone pro 9cm Platte) auf zwei identische LB Platten mit Hilfe von Zahnstochern übertragen und über Nacht auf einen Durchmesser von etwa 3mm wachsen gelassen. Auf eine der beiden identischen Agarplatten wurde ein mit Bleistift markiertes Whatman 540 Papier gelegt und nach vollständiger Benetzung wieder abgezogen. Die Bakterienkolonien hafteten nun am Whatman Papier und wurden an der Luft getrocknet. Das Papier wurde nun mit den Kolonien nach oben in eine Petrischale gelegt und mit 0.5M NaOH überschichtet und 5min inkubiert. Anschließend mußte die Natronlauge möglichst quantitativ entfernt werden, was durch Legen des Filters auf Saugpapier geschah. Mit der selben Prozedur wurden die Bakterien anschließend 5min in 0.5M TrisHCl pH7.4, 5min in 2xSSC, zuletzt 1min in 95% Athanol inkubiert und luftgetrocknet. Das nun fertige Filter konnte ohne besondere Vorkehrungen aufbewahrt werden oder direkt zur Hybridisierung eingesetzt werden. Zur Hybridisierung wurde das Filter mit einer Lösung aus 6xNET (1x = 0.15M NaCl, 15mM TrisHCl pH8.0, 1mM EDTA), 10xDenhardts (1x = 0.02%BSA, 0.02%Polyvinylpyrrolidon-40, 0.02% Ficoll) und 0.1% SDS angefeuchtet und in 5ml Hybridisierungslösung (6xNET, 10xDenhardts, 0.1%SDS, 20pmol 32 P-Oligonukleotid) 1h bei der für das jeweilige Oligonukleotid berechneten Schmelztemperatur (t_m , Seite 9) abzüglich 5°C inkubiert. Dazu wurde das Filter blasenfrei mit der Hybridisierungslösung in eine Plastiktüte eingeschweißt. Nach der Hybridisierung wurde das Filter dreimal bei Raumtemperatur für 5min in je 100ml 6xSSC

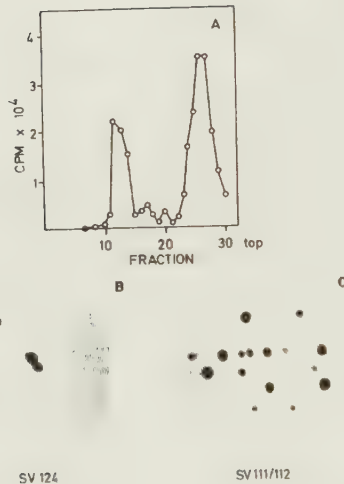


Abb. 5: Reinigung mutagenisierter DNA und Kolonie-
Hybridisierung

Einzelsträngige pSDL13-1.13 DNA wurde mit dem Oligonukleotid 111/112 mutagenisiert und über einen alkalischen 5-20%igen Sucrosegradienten wie beschrieben gereinigt. Vollständig aufgefüllte (kleinerer Peak) wurden von unvollständig aufgefüllten Molekülen (größerer Peak) abgetrennt. Zusätzlich ist das Ergebnis einer Koloniehybridisierung für zwei Mutanten gezeigt. Die dunklen Punkte zeigen die positiven Kolonien an.

(175,3g Natriumchlorid, 88,2g Natriumcitrat pro Liter Wasser) gewaschen und einmal in 6xSSC bei der Hybridisierungstemperatur für 5min. Das luftgetrocknete Filter konnte direkt zur Autoradiographie verwendet werden. Auf Grund der Versuchsbedingungen hybridisiert das zum Finden der positiven Klone und gleichzeitig zur Mutagenese eingesetzte Oligonukleotid nahezu ausschließlich an die mutierte DNA, da dieses nur zur mutierten DNA vollständig komplementär ist.

3.7. Charakterisierung der Mutanten

Von jeweils 4 nach der Kolonie Hybridisierung positiven Klonen wurde die Plasmid DNA isoliert (Maniatis et al., S. 368-369) und eine Restriktionskartierung vorgenommen. Dazu wurde die Plasmid DNA der jeweiligen Mutante mit dem entsprechenden Restriktionsenzym, das die durch das Oligonukleotid geschaffene neue Restriktionsschnittstelle (Seite 9, 10) erkennt, fragmentiert (Durchführung nach Vorschrift des Herstellers). Die Fragmente wurden in einem 2% Agarose Gel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht.

Den endgültigen Beweis, daß die Mutation an der gewünschten Stelle vorliegt, lieferte die Sequenzierung der DNA. Dazu diente die Dideoxymethode nach Sanger (Sanger et al., 1977) in einer von P. Heinrich abgewandelten Form zur Sequenzierung von doppelsträngiger DNA. Die Durchführung erfolgte genau nach Vorschrift von P. Heinrich (Heinrich, 1986; Chen et al., 1985), die auf Grund ihrer ausgesprochen genauen Beschreibung hier nicht beschrieben werden braucht.

3.8. Transfektion von DNA in eukaryontische Zellen

Es wurden zwei Methoden zur DNA Transfektion in eukaryontische Zellen verwendet. Die DEAE/Dextran Methode

(McCutchan und Pagano, 1968) wurde für die Replikationsexperimente, den Plaque Test und die subzelluläre Lokalisierung benutzt. Die Kalziumphosphat Methode (Pellicer et al., 1980; Graham et al., 1973) wurde angewendet, um die transformierten rat2 Zelllinien zu etablieren.

DEAE/Dextran Methode: die Zellen wurden vom Medium befreit, 1x mit Tris-Saline gewaschen und mit DEAE/Dextran (500ug/ml in Tris-Saline, 1ml pro 6cm Petrischale) überschichtet und 1h bei 37°C im CO₂-Brutschrank inkubiert. Die zu transfizierende DNA wurde vorher zu der Lösung gegeben. Bei Bedarf wurde anschließend Chloroquine enthaltendes Medium (100ug/ml, Luthman und Magnusson, 1983) zugegeben und weitere 4h inkubiert. Nach gründlichem Waschen mit Tris-Saline wurde normales Medium zu den Zellen gegeben. Mit dieser Methode kann die Ausbeute an transfizierten Zellen bis zu 60% gesteigert werden.

Kalziumphosphatmethode: Zwei Stunden vor der Transfektion wurde den Zellen frisches Medium gegeben. 5ug zu transfizierende DNA wurden in 217ul TE pH7.02 und 33ul 2M CaCl₂ gelöst. Diese Lösung wurde unter stärkstem Schütteln langsam in 250ul 2xHBS (280mM NaCl/ 1,5mM Na₂HPO₄/ 50mM Hepes/pH7.02) getropft und 15min stehen gelassen. Diese Suspension wurde auf die vom Medium befreiten Zellen (5x10⁶ Zellen pro 6cm Petrischale) gegeben und 30min im Brutschrank belassen. Anschließend wurden 5ml Medium zugegeben und weitere 4h inkubiert. Das Medium wurde abgegossen und die Zellen mit 1ml 1xHBS/20%Glycerin 2-3min überschichtet, gut mit Tris Saline gewaschen und durch normales Medium ersetzt.

3.9. Plaque Test

4x10⁶ Zellen auf einer Petrischale von 6cm Durchmesser wurden mit 100ng DNA in 500ul DEAE/Dextran Lösung wie auf Seite 26 beschrieben ohne Chloroquine Behandlung

transfiziert und über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 7ml 0.7%Agarose/lxDME/3%FCS überschichtet und 10 Tage inkubiert. Nach 4 Tagen wurden die Zellen mit 3ml der selben Mischung nachgefüttert. Die Anfärbung der Zellen erfolgte nach 10 Tagen über Nacht durch überschichten mit 3ml 0.7%Agarose/lxDME/ 0.01%Neutralrot. Durch Virus lysierte Zellen lassen sich nicht anfärben und ergeben helle Plaques.

3.10. Transformation von rat2 Zellen (Crowe et al., 1978)

Die nach der Kalziumphosphat Methode transfizierten rat 2 Zellen wurden etwa 24h nach Transfektion 1:6 umgesetzt und bis zu 20 Tage inkubiert. Nach 10, 15 und 20 Tagen wurden die Zellen jeweils einer Platte mit Äthanol fixiert und mit 1:10 verdünnter Giemsa Lösung (Merck Darmstadt Art.9204, Verdünnung mit heißem Leitungswasser) angefärbt, um die entstehenden Foci sichtbar zu machen. Die Foci auf den übrigen Petrischalen sollten nun im Lichtmikroskop (Abb. 19) und sogar mit dem bloßen Auge nach Abgießen des Mediums zu erkennen sein. Nach 18-20 Tagen wurden sie von einer Petrischalen mit Hilfe von Klonierringen abtrypsiniert und mit Weichagar vermischt.

Dazu wurde zuerst 4ml einer 0.6%Agarose/lxDME/10%FCS Mischung als Boden in eine Petrischale gegossen. Etwa 100 Zellen eines Focus wurden mit 5ml 0.3%Agarose/lxDME/10%FCS gut vermischt und in die vorbehandelte Petrischale gegeben und 3 Wochen inkubiert. Die Zellen wurden 2 mal pro Woche mit 3ml 0.3%Agarose/lxDME/10%FCS gefüttert. Die Weichagar Klone waren nach etwa 2 Wochen mit dem Auge als helle Punkte zu erkennen und wurden nach 3 Wochen mit einer Pasteurpipette dem Weichagar entnommen und auf eine 2cm Petrischale gegeben und in normalem Medium hochgezogen.

3.11. DNA Bindung

Mit einem modifizierten McKay Test wurden immunpräzipitierte T-Antigene der transformierten Zellen auf ihre Fähigkeit überprüft, ein den Replikationsursprungsort enthaltendes SV40 DNA Fragment spezifisch zu binden (Huber et al., 1985; Hinzpeter et al., 1986). Dazu mußten die transformierten Zellen lysiert werden, um das T-Antigen zugänglich zu machen. Die Zellen einer konfluenten 16cm Petrischale wurden 3x mit isotonischem Hanks Puffer (Hanks und Wallace, 1949) gewaschen, von der Schale abgeschabt und in ein Eppendorfgeläß überführt. Die Zellen wurden 1min abzentrifugiert, in 100ul Lysis Puffer (50mM TrisHCl pH 9.0, 120mM NaCl, 0.5% Nonidet P40) resuspendiert (Smith et al., 1978), 30min bei 0°C inkubiert und 10min zentrifugiert. Der Überstand konnte nun für die Bindungsexperimente verwendet werden.

Aus dem Überstand wurde das T-Antigen mit dem monoklonalen Antikörper Pab 108 und 30ul Staphylococcus aureus Suspension (Kessler, 1975 ; Geschenk, U. Markau) immungefällt und damit von anderen zellulären Proteinen abgetrennt (Fanning et al., 1982). Der Immunkomplex wurde 3x mit kaltem NET (50mM TrisHCl pH 7.5, 150mM NaCl, 5mM EDTA, 0.5% Nonidet P40) gewaschen und in 100ul Puffer A (10mM Hepes pH 7.8, 80mM KCl, 1mM DTT, 0,5mM MgCl₂, 1mM Phenylmethylsulfonylfluorid) aufgenommen. Es wurde 0.2mg/ml Glykogen und 1mg/ml Rinderserumalbumin zugegeben und weitere 30min bei 0°C inkubiert. 0.25ug HindIII geschnittene, 5'-³²P endmarkierte Plasmid DNA (pSV WT bzw. p1097) wurde zu dem Immunkomplex gegeben, 2h bei 0°C inkubiert und 3x mit NET gewaschen. Die gebundene DNA wurde durch Zugabe von Sample Puffer (0.125M TrisHCl pH 8.3, 20% Glycerin, 4%SDS, 10% Mercaptoethanol, 0.001% Bromphenolblau) und 10min erhitzen auf 65°C vom Immunkomplex getrennt. Die DNA wurde 5min in 95% Ethanol im Gel fixiert, das Gel getrocknet und autoradiographiert.

3.12. Größenbestimmung der T-Antigen Mutanten

Um zu prüfen, ob die transformierten rat2 Zellen T-Antigen Mutanten von WT T-Antigen Größe exprimieren, wurden die T-Antigene der transformierten Linien mit ^{35}S -Methionin markiert, immungefällt und auf einem Laemmli SDS-Polyacrylamid Gel (Laemmli, 1970) aufgetrennt.

Eine konfluente Schale mit der entsprechenden Zelllinie wurde 2h mit Medium inkubiert, dem die Aminosäure Methionin nicht zugesetzt war (-Meth-Medium). Das Medium wurde bis auf einen ml entfernt, 36ul (500uCi) ^{35}S -Methionin zugegeben und weitere 2h inkubiert. Es wurde 3 mal mit kaltem Hanks Puffer gewaschen, die Zellen in ein Eppendorfgefäß überführt, wie beschrieben lysiert, mit Pab108 immungefällt, 2 mal mit NET und 2 mal mit NET/0.5M LiCl gewaschen. Der Immunkomplex wurde durch 5min Kochen mit 20ul Sample Puffer (62,5mM TrisHCl pH 6.8, 10% Glycerin, 2%SDS, 5%Mercaptoethanol, 0.001% Bromphenolblau) gelöst und auf ein 10% Laemmli SDS-Polyacrylamid Gel mit 5% Sammelgel aufgetragen und elektrophoretisiert. Als Kontrolle wurde ein Zellextrakt anstelle von Pab 108 mit Maus IgG versetzt. Als Marker diente eine Lösung verschiedener Proteine bekannten Molekulargewichts. Die Elektrophorese fand etwa 3h bei 40mA statt. Das Gel wurde mit Coomassie Blau Lösung angefärbt, mit 10% Eisessig, 40% Methanol, 50% Wasser entfärbt, getrocknet und autoradiographiert.

3.13. Immunfluoreszenz und Immunperoxidase Färbung

Etwa 2×10^4 Zellen wurden in ein Abteil von Nunc Multidish Petrischalen (Durchmesser 1cm) umgesetzt und über Nacht anwachsen gelassen. Sie wurden mit 2ug ungeschnittener Plasmid DNA in 200ul DEAE/Dextran transfiziert. Nach 1h wurde zu der DEAE/Dextran Lösung zusätzlich 800ul Chloroquine enthaltendes 5%FCS Medium, wie auf Seite 26

beschrieben, gegeben. Nach 4h Inkubation wurde zweimal mit Tris/Saline gewaschen und die Zellen 3d in 5%FCS Medium inkubiert. Um Hintergrundphänomene bei der Immunfluoreszenz zu vermeiden, ist die Inkubation in 5%FCS Medium wichtig. Um das Adenovirus 2 Fiber Protein und das T-Antigen in der gleichen Zelle nachzuweisen, wurde 2d nach DNA Transfektion mit Adenovirus 2 (1 pfu/Zelle) infiziert und weitere 24h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 5min mit -20°C kaltem Methanol/Aceton Gemisch 1:1 fixiert und zweimal mit PBS gewaschen. Die Zellen konnten nun mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert werden. Die subzelluläre Verteilung des T-Antigens wurde im allgemeinen mit dem monoklonalen Antikörper Pab416 (Harlow et al., 1981), die des Hüllproteins VP1 mit Pab597 (E. Harlow, pers. Mitteilung) und das Ad2 Fiber Protein mit einem Anti Fiber Serum aus Kaninchen (Geschenk, W. Deppert, Universität Ulm) nachgewiesen. Wollte man das entsprechende Protein mit Hilfe der Immunperoxidase Färbung nachweisen, wurden zunächst die fixierten, gewaschenen Zellen mit 200ul entsprechenden Antikörper aus der Maus über Nacht bei 4°C inkubiert (5ug Antikörper/ml in PBS 10%FCS) und darauffolgend mit PBS 5x gewaschen. Als zweiter Antikörper diente ein mit Meerettich Peroxidase gekoppelter Anti-Maus Antikörper aus Kaninchen. Die Zellen wurden mit diesem Anti-Antikörper (Verdünnung 1/100 in PBS 10%FCS) 4h bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken inkubiert und 5x mit PBS gewaschen. Als Substrat für die Peroxidase diente 3,3'-Dimethoxybenzidin (o-Dianisidin). Eine äthanolisch gesättigte Substratlösung wurde 1:100 mit PBS verdünnt und 100ml dieser Lösung mit 7ul 30%H₂O₂ aktiviert. 200ul der fertigen Substratlösung wurden zu den Zellen gegeben und 20min bei Raumtemperatur inkubiert, zweimal mit bidestilliertem Wasser gewaschen und mit 200ul einer wässrigen 0.05%NaN₃ Lösung überschichtet. Die Petrischalen können nun einige Tage im Kühlschrank aufbewahrt werden. Das nachzuweisende Protein war nun durch braune Färbung im Phasenkontrast Mikroskop zu erkennen.

Mit Hilfe der Immunfluoreszenz erfolgte der subzelluläre Nachweis von T-Antigen und Fiber Protein in einer Zelle. Dabei war zu beachten, daß die verschiedenen Antikörper in der richtigen Reihenfolge mit den Zellen inkubiert wurden, um Kreuzreaktionen zwischen den Antikörpern zu vermeiden. Die fixierten, gewaschenen Zellen wurden zuerst mit 200ul 1:100 verdünnten Anti-Fiber Serum aus Kaninchen bei 4°C über Nacht inkubiert und 5x mit PBS gewaschen. Danach wurde 4h bei RT mit einem mit Texas Red gekoppelten Anti-Kaninchen Antikörper aus Esel (Verdünnung 1:100 in PBS 10%FCS) inkubiert und 5x mit PBS gewaschen. Das T-Antigen wurde nun mit Pab416 und mit FITC gekoppelten Anti-Maus Antikörper aus Kaninchen (FITC= Fluoresceinisothiocyanat, Verdünnung 1:40 in PBS 10%FCS) wie oben beschrieben nachgewiesen. Mit Hilfe der entsprechenden Farbfilter (Zeiss BP530-580 und FT600) konnten diese beiden Proteine separat in der gleichen Zelle im Fluoreszenz Mikroskop nachgewiesen werden (Abb. 26). Die Vergrößerung war entweder 300- oder 400-fach.

4. Ergebnisse

4.1. Oligonukleotid gesteuerte Mutagenese

Die von Zoller und Smith (1982) beschriebene Methode wurde in leicht abgewandelter Form (Seite 20) benutzt, um gezielt Mutationen im T-Antigen Gen zu erzeugen. Alle bekannten phosphorylierten Serin- und Threoninreste (Scheidtmann et al., 1984) wurden durch Alanin und in einem Fall durch Cystein ersetzt (Abb. 6). Obwohl diese Austausche chemisch unähnlich sind, gehören sie mit zu den am häufigsten beobachteten "stillen" Aminosäureaustauschen, d.h. die Funktion eines bestimmten Proteins hat sich durch Austausche während der Evolution nicht geändert (Dayhoff, 1972). Diese bestimmten Substitutionen wurden vorgenommen mit der Absicht, die räumliche Struktur und Stabilität des Proteins durch den Austausch nicht zu verändern, so daß eventuell später beobachtete Phänotypen im wesentlichen auf dem Wegfall der negativ geladenen Phosphatgruppen an den Serin- bzw. Threoninresten beruhen und nicht auf der Art des Aminosäureaustausches. Threonin 124 sollte auch durch andere hydrophile Gruppen wie Serin, Asparaginsäure und Glutaminsäure ersetzt werden. Die "sauren" Austausche wurden vorgenommen, um die negative Ladung der Phosphatgruppe am Threonin 124 zu simulieren. Die Aminosäuresubstitutionen wurden mit Hilfe der Oligonukleotid gesteuerten Mutagenese vorgenommen. Mit dieser Methode war es möglich, das T-Antigen Gen gezielt so zu verändern, daß dieses nun für ein mutiertes Protein kodiert. Die Triplets, die für die phosphorylierten Aminosäuren kodieren, wurden so mutiert, daß diese neben der Information für die neue Aminosäure eine zusätzliche Restriktionsenzym-Schnittstelle enthielten, um die Mutation schnell verifizieren zu können (Tabelle 1).

Die im Methodenteil beschriebene Reinigung der Heteroduplex DNA und das Ergebnis einer Koloniehybridisierung ist in Abb. 5 gezeigt. Zu erkennen sind die zwei erwarteten Peaks. Die

Abb. 6: Aminosäuresubstitutionen

Alle phosphorylierten Aminosäuren des T-Antigens wurden durch nicht phosphorylierbare Aminosäuren, im allgemeinen Alanin und in einem Fall Cystein, ersetzt. Threonin 124 sollte zusätzlich durch andere hydrophile Gruppen wie Asparaginsäure, Glutaminsäure und Serin ersetzt werden.

schneller sedimentierende Fraktion (linker Peak) repräsentiert die bei der Mutagenese Reaktion vollständig aufgefüllten, kovalent geschlossenen Moleküle, die aufgrund ihrer Verknäuelung schneller durch den Gradienten wandern. Unvollständig aufgefüllte Moleküle werden im alkalischen Sucrose Gradienten denaturiert und durchwandern ihn langsamer (rechter Peak). Die DNA der schneller sedimentierenden Fraktion wurde wie beschrieben in Bakterien transfiziert und die erhaltenen Kolonien mit Hilfe der Koloniehybridisierung auf positive Klone untersucht (Abb. 5). Die schwarzen Punkte zeigen Bakterienkolonien an, die die gewünschte mutierte Plasmid DNA enthalten. Tabelle 3 gibt die Mutantenausbeute und die vorgenommenen Nukleotidaustausche wider. Die Mutanten-Ausbeute war sehr unterschiedlich. Theoretisch sollte bei semikonservativer Vermehrung eines Heteroduplex-Moleküls die Mutanten-Ausbeute 50% betragen. Kramer et al. (1984) untersuchten den Einfluß der Art der Basenfehlpaarung auf die Reparaturhäufigkeit. Sie beobachteten einen Zusammenhang zwischen dem Methylierungszustand des Heteroduplex-Moleküls und der Reparaturhäufigkeit der Fehlpaarung. Die Struktur der Basen/Basen Fehlpaarung sollte ebenso eine Rolle spielen. Beim Vergleich der Daten von Kramer et al. (1984) mit meinen konnte keine Übereinstimmung festgestellt werden. Die meisten zur Mutagenese eingesetzten Oligonukleotide enthielten mindestens zwei Fehlpaarungen und stellten somit ein komplexeres System dar. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß die Qualität der Klenow-Polymerase einen Einfluß auf die Mutantenausbeute hat, nicht aber die Länge des Oligonukleotides (Tabelle 2). Neuere Veröffentlichungen beschreiben Techniken zur Verbesserung der Mutantenausbeute bis zu 100% durch Benutzen eines Uracil enthaltenden Einzelstrangs (Kunkel, 1985), oder durch selektive genetische Marker enthaltende Einzelstränge, die mit zwei Startern aufgefüllt wurden (Carter et al., 1985). Die Frage nach der Ausbeute spielte in meinem Versuch nur eine

OLIGONUCLEOTIDE-DIRECTED MUTAGENESIS OF SV40 T-ANTIGEN

MUTANT	MISMATCH	% MUTANT COLONIES	AMINOACID WT/MUTANT
SV 106	T/G	6 ^a	SER/ALA
SV 111/112	T/G A/T	42 ^b , 16 ^c	SER-SER/ALA-CYS
SV 120	T/G T/G	18 ^a	SER/ALA
SV 123	T/G	1 ^b , 1 ^{b,c}	SER/ALA
SV 124	T/G A/G	2 ^b	THR/ALA
SV 639	A/G G/C C/G	20 ^b	SER/ALA
SV 676	G/A T/G C/T	7 ^b	SER/ALA
SV 677	C/A T/G A/T	21 ^b	SER/ALA
SV 679	G/A T/G	45 ^b	SER/ALA
SV 701	A/G A/G	2 ^a	THR/ALA
SV 124D/E	T/G T/G A/G A/G C/A C/A T/A	26 ^b (31%/69%) ^d	THR/ASP THR/GLU
SV124S	T/G C/G	9 ^b	THR/SER
SV120MR	G/T G/T	14 ^e	ALA/SER
SV123MR	G/T	4 ^e	ALA/SER
SV124MR	G/T G/A	3 ^e	ALA/THR

Tabelle 2: Mutanten Ausbeute

Die Ausbeute an positiven Kolonien nach einer Kolonie Hybridisierung (s. Abb. 5) wird gezeigt. Ebenso werden die Nukleotidaustausche beschrieben. Die Exponenten beschreiben die Benutzung verschiedener Klenow Polymerasen bei der Mutagenesereaktion, sowie die Benutzung zweier Oligonukleotide verschiedener Länge mit der gleichen Information. (Klenow Polymerase von a, Stehelin; b, Biolabs; e, Pharmacia (HPLC gereinigt); c, Benutzung eines 21mers (Oligonukleotid 123-2) anstelle des 17mers (123-1) mit der gleichen Information; d, dieses Oligonukleotid enthält die Information für zwei Aminosäure Substitutionen (Seite 9), was durch Restriktionsfragmentierung unterschieden werden konnte (Seite 10), Ausbeute: 31% SV124D, 69% SV124E).

untergeordnete Rolle, da selbst bei der niedrigsten beobachteten Ausbeute von 1% (SV123) auf Grund der Versuchsbedingungen genügend Mutanten zur Verfügung standen.

Mit Hilfe dieser Methode wurden 13 SV40 Mutanten hergestellt. Alle bekannten phosphorylierten- (Scheidtmann et al., 1984a) wurden durch nicht phosphorylierbare Aminosäuren ersetzt. Die Mutanten wurden mit "SV" und der Nummer der ausgetauschten Aminosäure bezeichnet (Abb. 6). Zusätzlich wurden drei Marker Rescue Mutanten erzeugt. Sie sind mit dem Suffix MR gekennzeichnet.

4.2. Verifizierung der eingeführten Mutationen

Das Vorhandensein der gewünschten Mutation wurde mit zwei Methoden verifiziert. Die mit der Mutation eingeführte zusätzliche Restriktionsschnittstelle konnte durch Restriktionsfragmentierung nachgewiesen werden, doch konnte den endgültigen Beweis nur eine anschließende DNA Sequenzierung liefern.

Die Plasmid DNA der Mutanten wurde zunächst mit dem entsprechenden Restriktionsenzym fragmentiert und auf einem Agarose Gel aufgetrennt (Abb. 7). Tabelle 1 beschreibt die Nukleotid Nummer der eingeführten Restriktionsenzym Schnittstelle und die entsprechenden neuen SV40 Fragmente, die durch Fragmentierung der Mutanten entstehen. Alle Mutanten zeigten das erwartete Restriktionsmuster. Die endgültige Bestätigung der gewünschten Mutationen lieferte die DNA Sequenzierung. Alle N-terminalen Mutanten wurden mit dem Primer P1 (Seite 9), die C-terminalen Mutanten mit dem Primer P2 sequenziert. Für die Sequenzierung der Mutante SV639 stand kein Primer zur Verfügung. Mit Ausnahme von SV124D und SV124S zeigten die übrigen Mutanten die vorausgesagten Nukleotidaustausche. Diese sind auf den Sequenzgelen gekennzeichnet (Abb. 8-10), ebenso das neu entstandene Codon für die substituierte

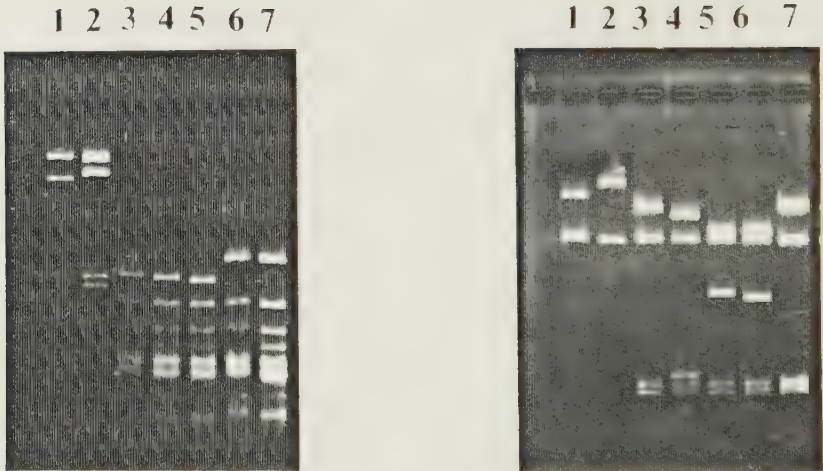


Abb. 7: Verifizierung der eingeführten Mutationen

Die Plasmid DNA der Mutanten, die eine neu geschaffene Restriktionsenzym Erkennungsstelle besitzen, wurde mit dem entsprechenden Enzym geschnitten und auf einem 2%igen Agarose Gel aufgetrennt. Als Kontrolle diente mit dem gleichen Enzym geschnittene WT DNA (pSDL13-1.13)

linkes Gel

- 1 SV124S/TaqI
- 2 WT/TaqI
- 3 SV676/AluI
- 4 SV677/AluI
- 5 SV679/AluI
- 6 SV111/112/AluI
- 7 WT/AluI

rechtes Gel

- 1 SV124D/BamHI
- 2 WT/BamHI
- 3 SV701/HhaI
- 4 SV639/HhaI
- 5 SV120/HhaI
- 6 SV106/HhaI
- 7 WT/HhaI

Aminosäure. Im Bereich von etwa 200 Basen konnten bei den sequenzierten Mutanten mit Ausnahme von SV124D und SV124S keine unerwünschten Zusatzmutationen festgestellt werden.

Die Mutanten SV124S und SV124D hatten im Bereich der erwarteten Mutationen Wildtyp Sequenz, obwohl das Restriktionsmuster für die erwartete Mutation an der gewollten Position sprach. Die gewünschte Restriktionsschnittstelle konnte im Falle von SV124D 61 Basen und im Falle von SV124S 53 Basen in 3'-Richtung von der gewünschten Position gefunden werden. Beide Mutanten enthalten eine Duplikation einer im Bereich der Mutation liegenden WT Sequenz, die in beiden Fällen an der Position 4447 im T-Antigen Gen (Thr 124) inseriert ist. Abb. 11 zeigt die Sequenzgele der beiden Mutanten im Bereich der Duplikation. Diese ist jeweils mit dem ersten und letzten Nukleotid gekennzeichnet. Als Vergleich ist eine WT Sequenz gezeigt. Die eingeschobenen duplizierten Sequenzen enthalten an ihrem 3' Ende die gewünschten Nukleotidaustausche, die mit einem Sternchen gekennzeichnet sind. Im Falle von SV124D enthält die Duplikation drei, im Falle von SV124S zwei Mutationen am 3' Ende, die durch die Oligonukleotide hervorgerufen wurden. Durch den Einschub kommt es für beide Mutanten zu einer Verschiebung des Leserasters gegenüber WT ab der Aminosäure Phenylalanin 138 (SV124S) und Prolin 139 (SV124D). Von dieser Position an kodiert nun das Gen beider Mutanten für eine völlig neue Aminosäuresequenz. Abb. 12 zeigt die genaue Konstruktion dieser duplizierten WT Sequenzen mit der Integrationsstelle im T-Antigen Gen, den Nukleotidaustauschen und dem Beginn des veränderten Leserasters. Die Pfeile an den Einschüben zeigen das 5'-Ende der zur Mutagenese eingesetzten Oligonukleotide 124D und 124S an, der Pfeil oberhalb der WT Sequenz das 3'-Ende von 124D, unterhalb das 3'-Ende von 124S.

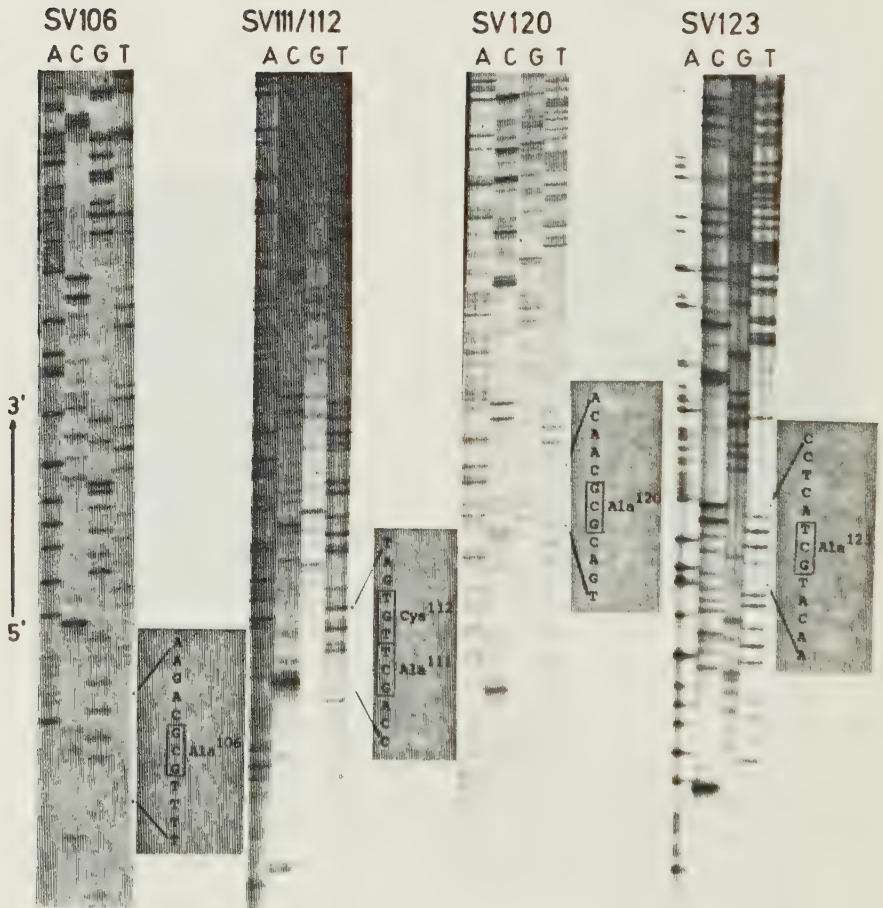


Abb. 8: Sequenzgele

Die Sequenzgele der Mutanten im Bereich der Mutation werden gezeigt. Die mit ^{35}S -dATP (650Ci/mmol; 16uCi pro Ansatz) markierten, bei der Sequenzierung entstandenen, Oligonukleotide wurden auf einem 6%igen Polyacrylamid/8M Harnstoff Gel aufgetrennt und autoradiographiert. Mit dem Starter P1 wurden die N-terminalen- und mit P2 die C-terminalen Mutanten sequenziert. Im Bereich der Mutationen ist die Sequenz seitlich beschrieben, das mutierte Codon für die substituierte Aminosäure ist eingrahmt.

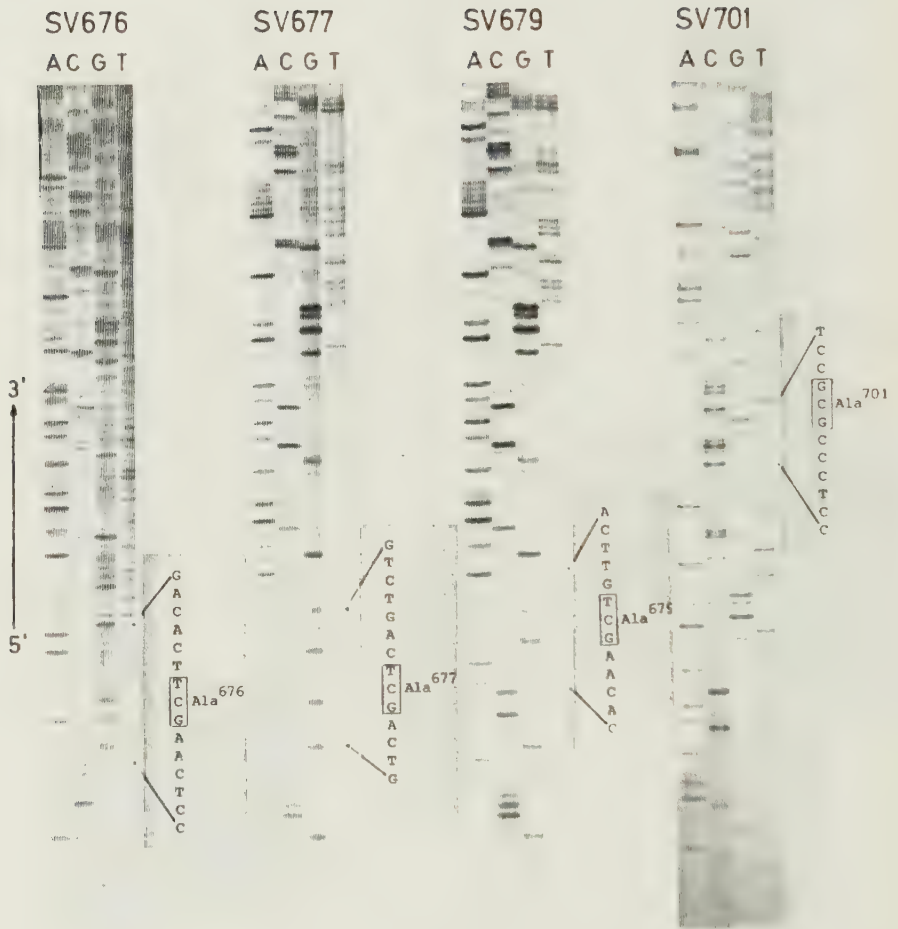


Abb. 10 Sequenzgele (s. Abb. 8)

WT SV124D SV124S

A C G T | A C G T | A C G T

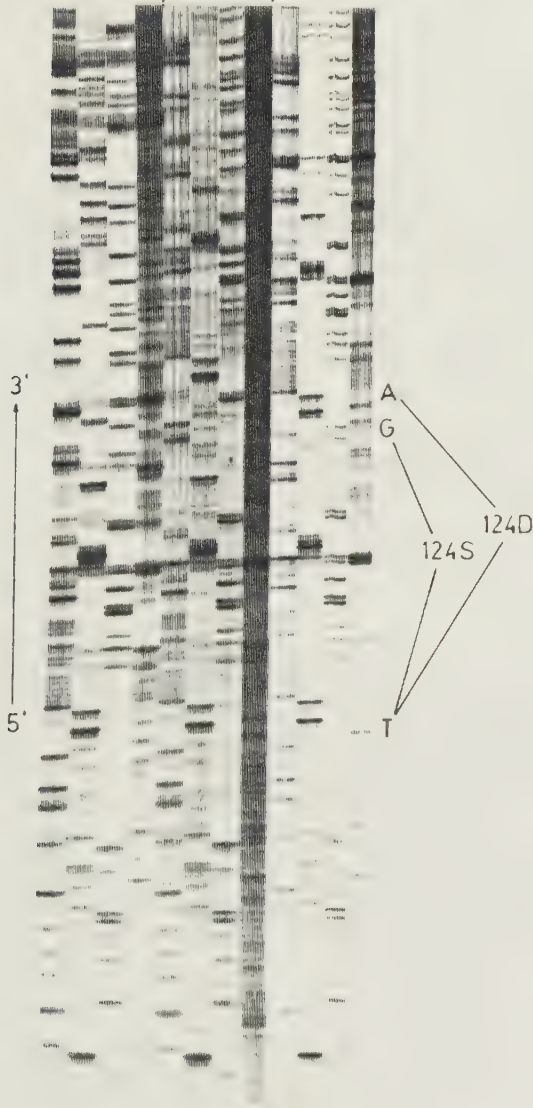


Abb. 11: Sequenzgel der Mutanten SV124D und SV124S

Gezeigt wird die Sequenz dieser beiden Mutanten mit den beschriebenen Duplikationen. Die genaue Sequenz der Duplikationen und ihre Integrationsstelle in das SV40 Genom ist in Abb. 11 gezeigt. Die erwarteten Austausche hätten sich am 5'-Ende der Integrationsstelle (Thr124) befinden sollen.

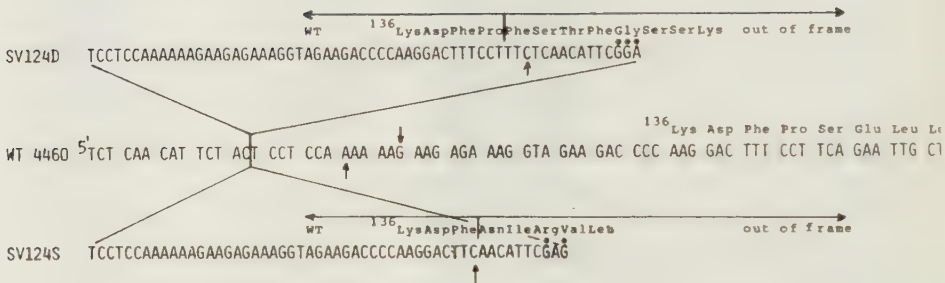


Abb. 12: Sequenz der Duplikationen von SV124D und SV124S

Die Duplikationen beider Mutanten sind an derselben Position 4447 in das SV40 Genom integriert. Setzt man die eingerahmten Sequenzen in die WT Sequenz ein, so ergibt sich die Sequenz der jeweiligen Mutante. Die 3' Enden der Duplikationen enthalten die erwarteten Nukleotidaustausche (durch * gekennzeichnet), so daß die neu geschaffene Restriktionsschnittstelle um die Länge der jeweiligen Duplikation in 3' Richtung verschoben ist. Die Pfeile an den Einschüben zeigen das 5'- und das 3'-Ende der zur Mutagenese eingesetzten Oligonukleotide an.

4.3. DNA Replikation

Die Fähigkeit der Mutanten zur Initiation der DNA Replikation wurde in permissiven TC7 Affenzellen (Robb und Huebner, 1973) getestet. 5×10^5 Zellen wurden mit λ g BamHI linearisierter Plasmid DNA wie beschrieben transfiziert und 9 Tage in Kultur gehalten. Die niedermolekulare DNA (replizierte Virus DNA) wurde isoliert (Hirt, 1967) und mit BamHI und DpnI fragmentiert, so daß nur replizierte nicht methylierte DNA nachgewiesen werden konnte. Diese wurde auf einem 0.8% Agarose Gel aufgetrennt und auf ein Nitrozellulose Filter übertragen (Southern, 1975). Die auf dem Filter gebundene DNA wurde gegen ^{32}P -markierte nicktranslatierte pSV-WT DNA hybridisiert und das gewaschene Filter anschließend autoradiographiert.

Abb. 13 zeigt das Ergebnis. Die Mutanten SV106, 677 und 701 replizieren Wildtyp ähnlich, SV120, 123, 124, 639 und 676 sind replikationsnegativ, SV111/112, 124D und 124E sind replikationsdefekt und SV679 repliziert sogar besser als SV40 WT DNA. Um das Replikationsverhalten der Mutante SV679 genauer zu untersuchen, wurde die replizierte DNA dieser Mutante 5, 7 und 9 Tage nach Transfektion isoliert (Abb. 14). Zu erkennen ist, daß zu jeder Zeit nach Transfektion mehr gegenüber Wildtyp replizierte SV679 DNA vorliegt.

Um zu zeigen, daß der Replikationsdefekt auf die Mutation im T-Antigen zurückzuführen ist und nicht auf einen funktionsbeeinträchtigten Replikationsursprungsort zurückzuführen ist, wurde die DNA Replikation aller Mutanten in COS Zellen (Gluzman, 1981) untersucht. Diese Zellen sind mit einer Replikationsursprungsort defekten SV40 Mutante transformiert. Sie exprimieren konstitutiv Wildtyp T-Antigen, das die Replikation einer replikationsdefekten T-Antigen Mutante initiieren kann, wenn der Replikationsursprungsort der Mutante funktionsfähig ist. Das Replikationsexperiment wurde wie oben beschrieben

DNA REPLICATION

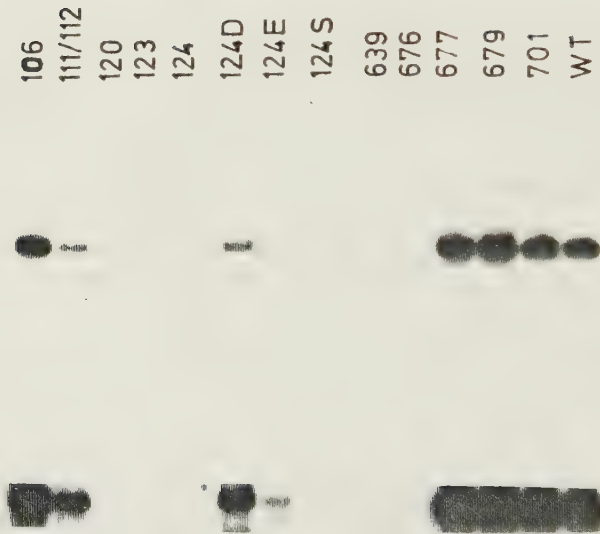


Abb. 13: DNA Replikation in TC7 Zellen

Die Fähigkeit zur DNA Replikation aller Mutanten in TC7 wurde getestet. 5×10^5 Zellen wurden mit λ g BamHI linearisierter Plasmid DNA transfiziert und nach 9d die niedermolekulare DNA isoliert. Nach Fragmentierung mit BamHI und DpnI wurde diese auf einem 0.8% Agarose Gel aufgetrennt. Die DNA wurde auf ein Nitrozellulose Papier übertragen und mit ^{32}P -markierter nicktranslatierter pSV-WT DNA (Geschenk B. Huber) hybridisiert und autoradiographiert. Die untere Spur gibt eine 5x längere Exponierung desselben Filters an.

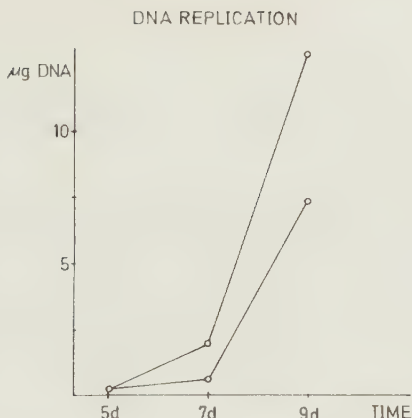


Abb. 14: Replikationskinetik der Mutante SV679

1 µg mit BamHI geschnittene SV679 (obere Linie) bzw. pSDL13-1.13 DNA wurde wie beschrieben in TC7 Zellen transfiziert, nach 5, 7, und 9 Tagen die niedermolekulare DNA isoliert, mit BamHI und DpnI verdaut und auf einem 0.8% Agarose Gel aufgetrennt. Anschließend wurde sie auf Nitrozellulose Papier übertragen, gegen ^{32}P markierte pSV-WT DNA hybridisiert und das Autoradiogramm densitometrisch vermessen.

DNA REPLICATION

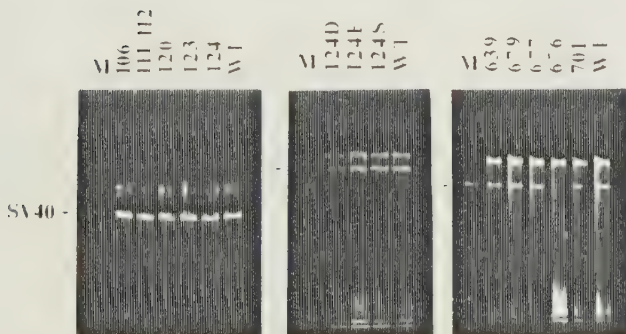


Abb. 15: Replikation in COS-Zellen

1 µg mit BamHI linearisierter Plasmid DNA aller Mutanten wurde wie geschrieben transfiziert, die replizierte DNA nach 6 Tagen isoliert und BamHI und DpnI fragmentiert. Die Auftrennung erfolgte auf einem 0.8% Agarose Gel. Als Marker diente mit BamHI linearisierte pSDL13-1.13 DNA. Die DNA wurde mit Ethidiumbromid angefärbt.

durchgeführt, allerdings nicht auf ein Nitrozellulosefilter übertragen, sondern direkt im Agarose Gel mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht (Abb. 15).

Mit Ausnahme von SV676 replizieren alle Mutanten in COS Zellen wildtyp ähnlich. Das bedeutet, daß die Ursache für den Replikationsphänotyp der defekten und negativen Mutanten nicht auf einem Defekt des Replikationsursprungsortes beruht. Der Defekt der Mutante SV676 wird auf Seite 72 diskutiert.

4.4. Plaque Test

Um zu prüfen, ob die Mutanten in der Lage sind Viruspartikel zu bilden, wurden sie wie beschrieben einem Plaque Test unterzogen. 4×10^5 TC7 Zellen wurden mit 100ng Plasmid DNA transfiziert und die Zellen nach 10 Tagen mit Neutralrot angefärbt. Durch Virus lysierte Zellen lassen sich mit Neutralrot nicht anfärben und sind als helle Plaques sichtbar. Tabelle 3 zeigt die Anzahl der Plaques aus 2 verschiedenen Experimenten nach 10 Tagen. Alle replizierenden Mutanten ergaben Plaques. Die replikationsdefekte Mutante SV111/112 machte gegenüber WT etwa 50% weniger Plaques. Die C-terminalen Mutanten SV677, SV679 und SV701 wurden in einem anderen Experiment getestet. Hierbei wurde mit der Anfärbung der Zellen zu lange gewartet. Deutlich waren Plaques zu erkennen, die aber auf Grund ihrer Größe nicht auszuzählen waren, da sie ineinander übergingen.

Um nun zu prüfen, ob der Phänotyp der im Replikations- und Plaquetest negativen Mutanten ausschließlich auf der gewollten Mutation beruhte und nicht durch phänotypische Zweitmutationen hervorgerufen wurde, wurden die drei Mutanten SV120, 123 und 124 einem Marker Rescue Experiment unterzogen.

MUTANTE	PLAQUES ^A
WT	53 / 57
SV106	56 / 62
SV111/112	21 / 27
SV120	0 / 0
SV123	0 / 0
SV124	0 / 0
SV120MR	49 / 53
SV123MR	51 / 53
SV124MR	45 / 53
SV676	0 / 0
SV677	+ ^B
SV679	+ ^B
SV701	+ ^B

A) Anzahl von Plaques pro 100ng
transfizierter DNA aus zwei
verschiedenen Experimenten

B) Plaques zu groß, daher nicht
auszählbar

Tabelle 3: Plaque Test

Die Anzahl an Virus Plaques aus zwei verschiedenen Experimenten in TC7 Zellen 10Tage nach Transfektion von 100ng linearisierter Plasmid DNA wird gezeigt.

4.5. Marker Rescue

Die drei Mutanten SV120,123 und 124 wurden mit dem Oligonukleotid MRI (Seite 9) mutagenisiert. Dieses Oligonukleotid besteht aus einer Wildtyp-Sequenz, die die Codons der Aminosäuren 120 bis 124 überspannt. Wird nun einzelsträngige SV120,123 oder 124 DNA mit diesem Oligonukleotid mutagenisiert, sollte man Mutanten erhalten, die vom WT nicht unterscheidbar sind. Es sollte nur die frühere, gewünschte Mutation beseitigt werden, unerwünschte Sekundärmutationen sollten erhalten bleiben. Im Falle des Vorhandenseins solcher unerwünschter Sekundärmutationen sollte sich der Phänotyp von SV120,123 und 124 durch das "Marker Rescue" Experiment nicht ändern. War der Phänotyp ausschließlich durch die gewünschte Mutation bedingt, sollte man die neuen Mutanten SV120MR,123MR und 124MR nicht vom Wildtyp unterscheiden können.

Die "Marker Rescue" Mutanten wurden wie beschrieben einem Replikationstest in TC7 Zellen und einem Plaquetest unterzogen. Sie verhielten sich in beiden Experimenten Wildtyp ähnlich (Tabelle 3, Abb. 16), so daß man unerwünschte phänotypische Zweitmutationen für diese drei Mutanten ausschließen kann, nicht aber "stille" Sekundärmutationen. Der Phänotyp anderer Mutanten wurde durch Testen unabhängig voneinander erhaltenen Isolate bestätigt.

4.6. Transformation von Rattenzellen

Die onkogene Transformation von rat2 Ratten Fibroblastenzellen (Topp, 1981) durch die SV40 Mutanten wurde getestet. Es gibt temperatursensitive T-Antigen tsA Punktmutanten, die transformationsnegativ sind (Tegtmeyer, 1972). Die Stabilität dieser tsA Mutanten ist durch den Austausch einzelner Aminosäuren deutlich beeinflusst. Mit diesen Mutanten konnte gezeigt werden, daß ein intaktes

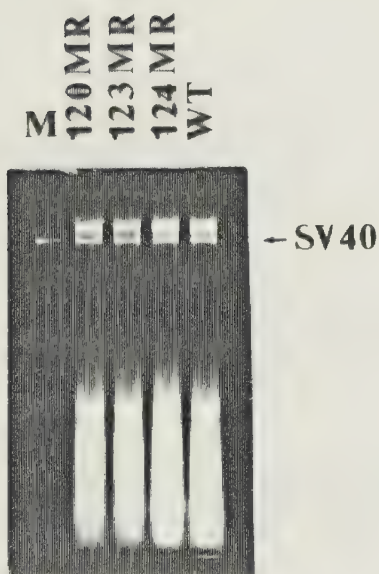


Abb. 16: DNA Replikation der Marker Rescue Mutanten

lug mit BamHI linearisierte DNA wurde in 5×10^5 TC7 Zellen transfiziert und die replizierte DNA nach 8 Tagen isoliert. Sie wurde mit BamHI und DpnI fragmentiert, auf einem 0.8% Agarose Gel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt.

T-Antigen für die Initiation und Aufrechterhaltung der Transformation verantwortlich ist. Die Mutanten, die in der Lage sind, rat 2 Zellen zu transformieren, sollten also stabile T-Antigene ausbilden. Sollten nun z.B. die Mutanten SV120,123 und 124 rat2 Zellen transformieren, wäre dies ein Beweis dafür, daß die Stabilität des mutierten T-Antigens durch diese bestimmte Substitution nicht beeinträchtigt ist.

5×10^5 rat2 Zellen wurden wie beschrieben mit 5 μ g EcoRI linearisierter Plasmid DNA transfiziert und die Zellen nach 10, 15 und 20 Tagen mit Giemsa angefärbt. Da die transformierten Zellen in der Lage sind, dichter und mehrschichtig zu wachsen, erscheinen diese als dunkle Punkte (Foci). Abb. 17 und 18 zeigen mit Giemsa angefärbte rat2 Zellen, die mit verschiedenen Mutanten transformiert worden sind. Deutlich zu erkennen ist, daß die N-terminalen Mutanten mit Wildtyp Häufigkeit transformieren, während die abgebildeten C-terminalen Mutanten eine gegenüber Wildtyp deutlich geringere Foci Bildung aufweisen. Abb. 19 zeigt einen mit dem Mikroskop aufgenommenen Focus einer mit SV106 transformierten und im Vergleich eine nicht transformierte rat2 Zelllinie. Nach 20 Tagen wurden die Foci mit Hilfe von Klonierringen und Trypsin von der Petrischale gelöst und durch Züchten in Weichagar wie beschrieben gereinigt. Abb. 20 zeigt einen Focus in Weichagar nach 20 Tagen Wachstum. Mit Ausnahme der Mutanten SV 124D, 124S, 639 und 676 wuchsen alle übrigen Mutanten in Weichagar und konnten als gereinigte und stabile Zelllinien etabliert werden.

Tabelle 4 beschreibt die Anzahl an Foci nach 20 Tagen Kultivierung. Demnach transformieren die N-terminalen Mutanten mit Ausnahme von SV124D und SV124S mit Wildtyp Häufigkeit, die C-terminalen Mutanten SV639,676,677 und 679 zeigen gegenüber Wildtyp eine deutlich geringere Foci Bildung.

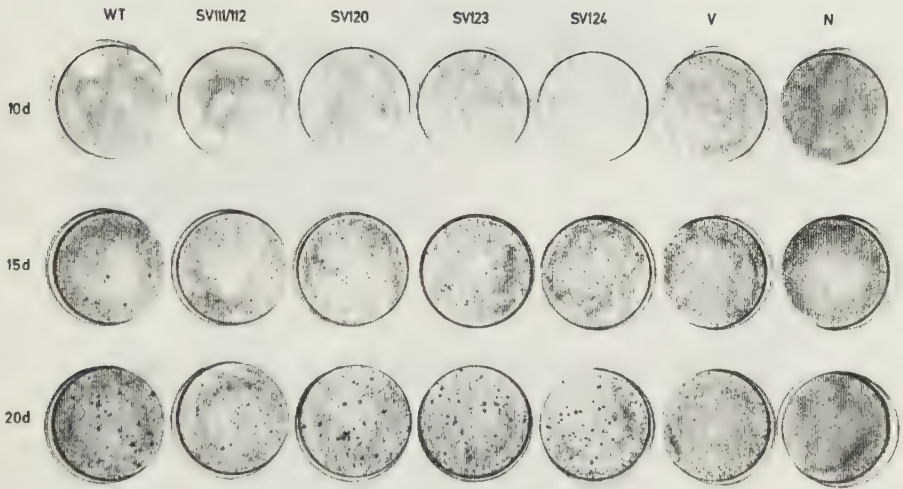


Abb. 17: Transformation von rat2 Zellen (1)

5µg mit EcoRI linearisierte Plasmid DNA einiger N-terminaler Mutanten wurde wie im Text beschrieben in rat2 Zellen transfiziert und die Zellen nach 10, 15 und 20 Tagen mit Giemsa angefärbt. Auf Grund des dichteren Zellwachstums werden die Foci stärker angefärbt und ergeben die dunklen Punkte.

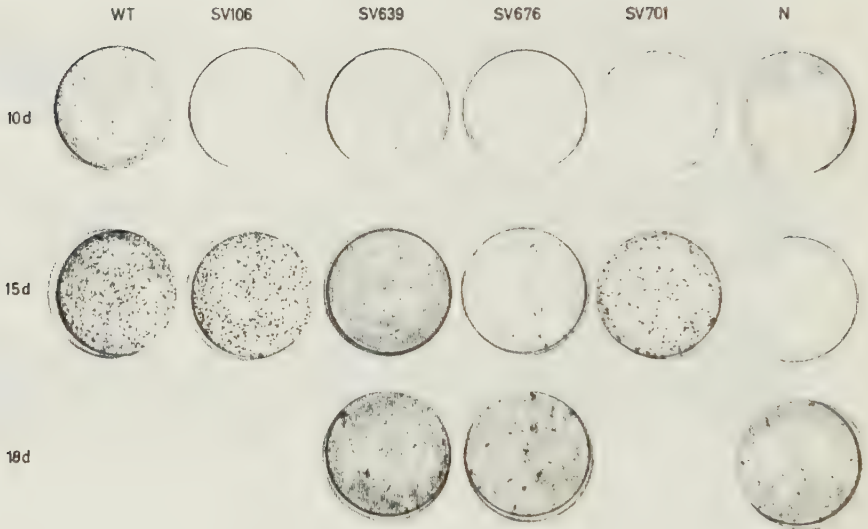
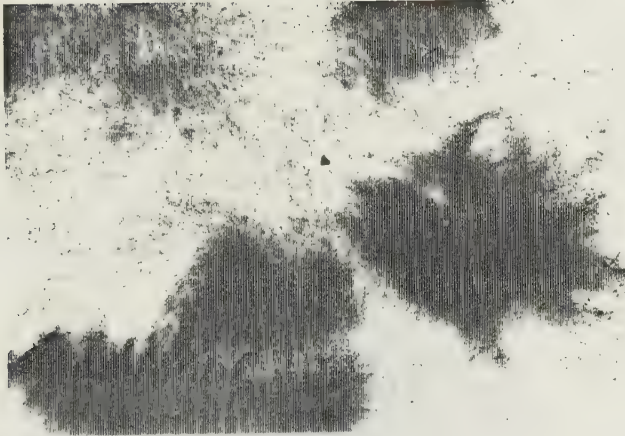
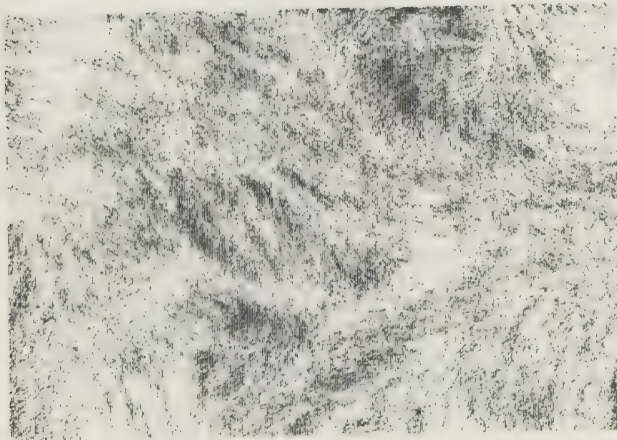


Abb. 18: Transformation von rat2 Zellen (2)

Dieser Versuch wurde wie in Abb. 17 beschrieben durchgeführt.



1



2

Abb. 19: Mikroskopischer Vergleich transformierter und nicht transformierter rat2 Zellen

Ein in Abb.17 dargestellter Focus der Mutante SV123 (1) und nicht transformierte rat2 Zellen (2) wurden bei 160facher Vergrößerung aufgenommen.

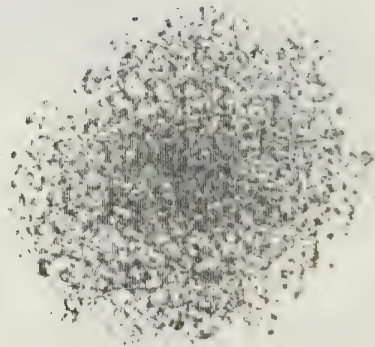


Abb. 20: Wachstum einer transformierten rat2 Zelle in Weichagar

Ein nach 20 Tagen in Weichagar gewachsener Klon der Mutante der Mutante SV123 wurde bei 400facher Vergrößerung aufgenommen. Die Weichagar Klone können nach 15 Tagen bereits mit dem bloßen Auge gesehen werden.

MUTANT DNA	TRANSFORMATION (FOCI, % OF WT) ^A
106	105
111/112	92
120	88
123	103
124	107
124D	<0.5
124E	100
124S	<0.5
639	<0.1
676	5
677	7
679	36
701	94
VECTOR	<0.1
NO DNA	<0.1

^AWT DNA 930, 180, 252 FOCI/5 μ g DNA IN THREE
DIFFERENT EXPERIMENTS

Tabelle 4: Transformation von rat2 Zellen

Es wird die Anzahl an Foci aller Mutanten gegenüber WT aus drei verschiedenen Experimenten bezogen auf 5 μ g transfizierte DNA dargestellt. Als Kontrolle wurde das Experiment mit Vektor- bzw. ohne DNA ausgeführt.

4.7. Expression der T-Antigen Mutanten

Mit Hilfe des Immunperoxidase Tests wurde die Expression der T-Antigene in den transformierten rat2 Linien gezeigt. Gleichzeitig konnte damit nachgewiesen werden, daß alle Zellen einer Linie transformiert waren. Bei erfolgreicher Klonierung der einzelnen Zelllinien in Weichagar sollten diese frei von nicht transformierten rat2 Zellen sein. In allen Fällen konnten stabile gereinigte transformierte Zelllinien erhalten werden (Ergebnisse nicht gezeigt).

Durch ^{35}S -Methionin Markierung und anschließender Immunpräzipitation der T-Antigene aus den transformierten Zelllinien mit dem monoklonalen Antikörper Pab 108 wurde wie beschrieben die Größe der T-Antigen Mutanten bestimmt. Abb. 21 zeigt die Auftrennung der gereinigten T-Antigen Mutanten auf einem SDS Polyacrylamid Gel. Zu erkennen ist, daß alle transformierten rat2 Linien T-Antigen exprimieren, dessen Größe der des Wildtyps entspricht. Die zweite, auf dem Gel zu erkennende, dominante Bande repräsentiert das zelluläre Phosphoprotein p53. Dieses Protein bindet an T-Antigen und wird also mit copräzipitiert (Carroll und Gurney, 1982).

4.8. DNA Bindung

Die T-Antigene der transformierten rat2 Linien wurden benutzt, um ihre spezifische Bindungsfähigkeit an den SV40 Replikationsursprungsort zu testen. Diese Fragestellung ergab sich aus der positionellen Nähe der N-terminalen Phosphorylierungsdomäne und der viralen Bindungsdomäne des T-Antigens, wie in der Einleitung beschrieben.

Als Bindungstest diente ein modifizierter McKay Test (Huber et al., 1985; Hinzpeter et al., 1986). Die mutierten T-Antigene wurden wie beschrieben mit Pab108 immunpräzipitiert und mit HindIII fragmentierter 5'- ^{32}P

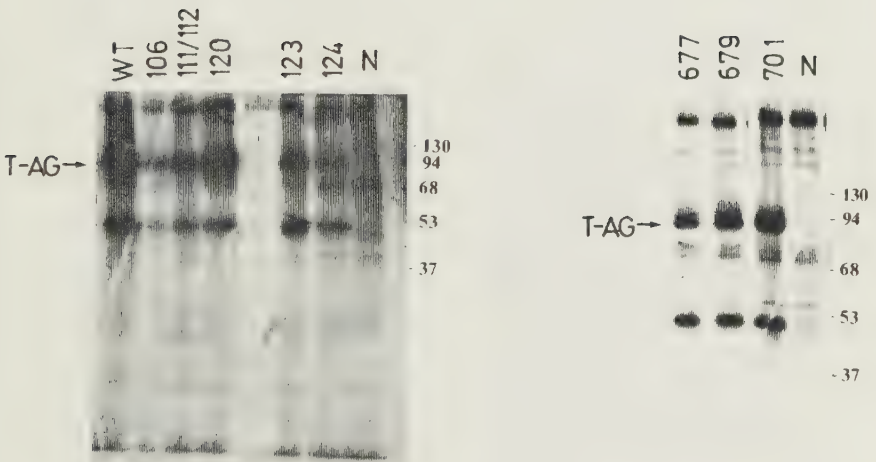


Abb. 21: Größenbestimmung der T-Antigen Mutanten

Etwa 1×10^6 Zellen wurden 2h mit 400uCi ^{35}S -Methionin markiert, die T-Antigene mit Pab 108 aus den Zellextrakten wie beschrieben immunpräzipitiert und auf einem 10%igen Laemmli SDS-Polyacrylamid Gel aufgetrennt. Als Kontrolle wurde ein Extrakt anstelle von Pab108 mit Maus IgG versetzt. Die Seitenzahlen geben die Größe von Marker Proteinen an. Alle T-Antigen Mutanten besitzen WT Größe.

endmarkierter pSV-WT- (Fanning et al., 1982) oder p1097 DNA (DiMaio und Nathans, 1979; Huber et al., 1985) versetzt. Pab108 bindet ein Epitop am extremen N-Terminus des T-Antigens (W. Deppert, Ulm, pers. Mitteilung) und erkennt alle Subklassen des Proteins (Huber et al., 1985). Die DNA Bindung wird von diesem Antikörper nicht beeinflußt (E. Vakalopoulou, München, Dissertation). Das T-Antigen sollte nun spezifisch das den Replikationsursprungsort enthaltende Fragment (HindIII C-Fragment) binden. Bindung an pSV-WT DNA reflektiert im wesentlichen das Bindungsverhalten an die Bindungsstelle I des Replikationsursprungsortes, da T-Antigen eine höhere Affinität für diese, als für die Bindungsstelle II besitzt (Myers et al., 1981a; Jones und Tjian, 1984). Mit der Deletionsmutante p1097 wurde die DNA Bindung an die Bindungsstelle II untersucht. Die T-Antigen Menge in den Zellextrakten wurde von A. Schmid in unserem Labor durch Binden an ein Nitrozellulose Filter und Anfärbung mit dem Biotin-Streptavidin System (Amersham und Buchler, Braunschweig) sichtbar gemacht und verglichen, so daß für die Bindungsexperimente annähernd gleiche Mengen an T-Antigen eingesetzt wurden. Für die Bindung an pSV-WT und p1097 DNA wurden die gleichen Zellextrakte verwendet, so daß die gleichen Mengen an T-Antigen für die Tests an Bindungsstelle I und II verwendet wurden.

Abb. 22 zeigt für den Fall der N-terminalen Mutanten, daß diese gleiche Mengen des pSV-WT DNA Fragments binden, das den Replikationsursprungsort enthält (pSV-WT HindIII C-Fragment), wie Wildtyp T-Antigen. Die Mutanten SV106, 111/112, 120 und 123 binden das Bindungsstelle II enthaltende Fragment von p1097 spezifisch, während SV124 und 124E kein Fragment von p1097 spezifisch binden. Mit Ausnahme von SV124 und SV124E binden also alle N-terminalen Mutanten Bindungsstelle I und II spezifisch. SV124 und SV124E binden nur Bindungsstelle I spezifisch. Bei den C-terminalen Mutanten sind deutliche Unterschiede hinsichtlich ihrer Bindungseigenschaften an Bindungsstelle I und II

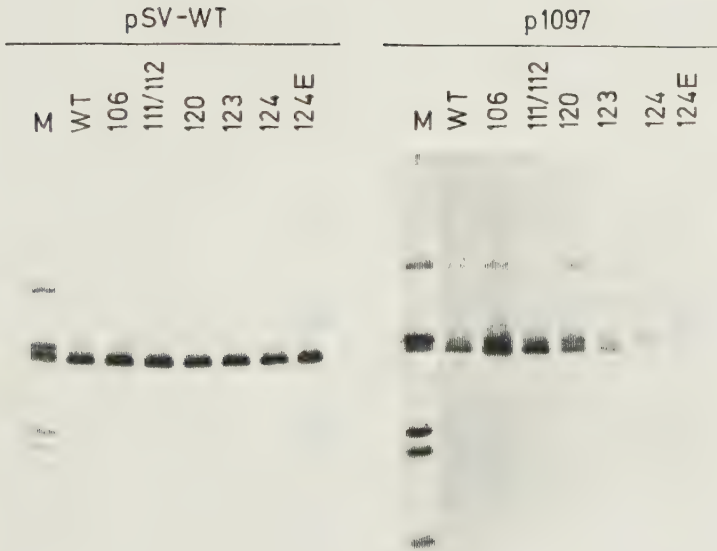


Abb. 22: DNA-Bindung (1)

Durch Immunpräzipitierung mit Pab108 gereinigte T-Antigene der transformierten rat2 Zelllinien wurden auf Bindung an HindIII geschnittene ^{32}P -endmarkierte pSV-WT- und p1097 Fragmente untersucht. Für die Bindung an die verschiedenen Klone wurden gleiche Mengen an T-Antigen eingesetzt. Als Marker (M) diente 12.5ng radioaktiv markierte HindIII geschnittene pSVWT bzw. p1097 DNA.

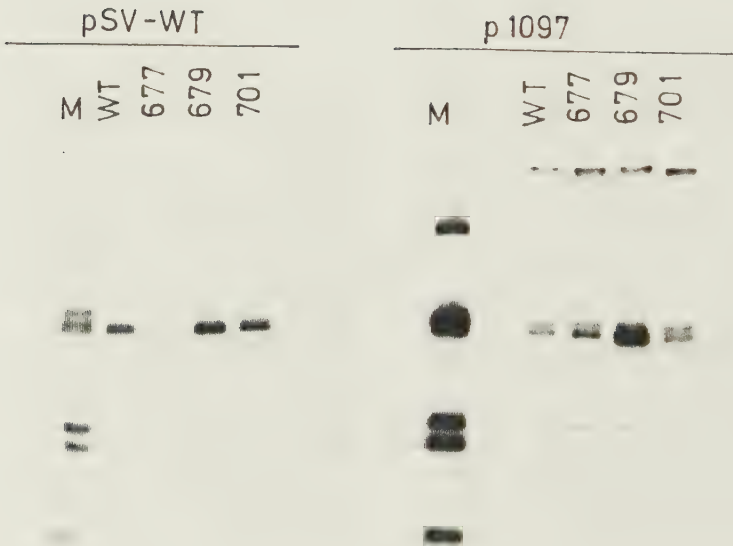


Abb. 23: DNA Bindung (2)

Gezeigt werden Bindungsexperimente mit den C-terminalen T-Antigen Mutanten wie in Abb. 22 beschrieben.

festzustellen (Abb. 23). SV701 bindet gleiche Mengen Bindungsstelle I enthaltendes Fragment wie Wildtyp T-Antigen, SV679 etwas mehr, dagegen bindet SV677 kaum an das pSV HindIII C-Fragment. An p1097 bindet SV701 Wildtyp ähnlich. SV677 bindet etwas mehr und SV679 deutlich mehr Bindungsstelle II enthaltendes Fragment. Die C-terminalen Mutanten SV677 und SV679 zeigen also bezogen auf Wildtyp ein verändertes Bindungsverhalten, sowohl Bindungsstelle I als auch II betreffend.

4.9. Subzelluläre Lokalisierung

Der Mechanismus, wie bestimmte Proteine in den Kern transportiert werden und ausschließlich dort akkumulieren, ist bis jetzt unbekannt. Dieses Problem gewinnt zunehmend an Interesse durch die Beobachtungen, daß sich biologische Aktivitäten im Kern (z.B. Replikation, Transkription und Kondensierung der Chromosomen) ändern, wenn Zellkerne in fremde Zellen transplantiert werden oder durch Zellfusionen (DeRobertis, 1983). Die Aufnahme von Proteinen durch Mitochondrien und Chloroplasten verläuft nach einem anderen Mechanismus als der Kerntransport. Ein reifes Protein enthält die gesamte Information, die für den Transport und die Akkumulation im Zellkern notwendig ist. Die Aufnahme von Proteinen in den Kern ist extrem selektiv (Dingwall, 1985). 1969 entdecken Butel et al. eine SV40 T-Antigen Mutante, die die Fähigkeit, im Zellkern zu akkumulieren, verloren hatte. Die Mutation betraf die Aminosäure 128. Ein positiv geladener Lysin- war durch einen neutralen Asparaginrest substituiert (Lanford und Butel, 1984). Dieser Lysinrest wird durch folgende Sequenz flankiert: Pro¹²⁶LysLysLysArg LysValGluAspPro¹³⁵. Andere Mutationen in diesem Bereich eliminieren ebenso die Fähigkeit des Proteins, sich im Kern zu konzentrieren (Kalderon et al., 1984). Weitere Untersuchungen zeigen, daß diese Sequenz unabdingbar für den Kerntransport des T-Antigen ist (Smith et al., 1985). Die

N-terminale Phosphorylierungsdomäne ist dieser Kerntransport Signalsequenz sehr nahe. Es stellte sich somit die Frage, ob durch Substitutionen der phosphorylierten Aminosäuren der Kerntransport beeinflusst würde.

Alle T-Antigen Mutanten wurden 2 Tage nach Transfektion nicht linearisierter Plasmid DNA wie beschrieben auf ihre subzelluläre Lokalisierung in TC7 Zellen mit Hilfe des Immunperoxidase Tests untersucht, ebenso die des Hüllproteins VP1. Die dafür benutzten Antikörper wurden im Methodenteil beschrieben und sind in den Legenden zu den Abbildungen gekennzeichnet.

Mit einer Ausnahme akkumulierte in allen Fällen T-Antigen und VP1 ausschließlich im Kern (Abb. 24, Tabelle 5). Überraschenderweise zeigte die Mutante SV676 einen ungewöhnlichen Phänotyp. Bei etwa 95% der Zellen war sowohl T-Antigen als auch VP1 zu etwa gleichen Teilen im Kern und Zytoplasma lokalisiert. Abb. 23 zeigt repräsentativ die subzelluläre Verteilung von T-Antigen und VP1 der Mutanten SV676 und SV677 sowie Wildtyp. Alle übrigen Mutanten zeigten das gleiche Erscheinungsbild wie SV677 und Wildtyp. Die Expression des Hüllproteins VP1 der nicht replizierenden und keine Viruspartikel bildenden Mutanten kann damit erklärt werden, daß mit der Transfektion sehr viel DNA in die Zelle gebracht wird und vorübergehend viel T-Antigen exprimiert wird, das die späte Proteinsynthese stimulieren könnte (s. Einleitung). Graessmann et al. (1976) konnten zeigen, daß nach Mikroinjektion von SV40 DNA in nicht permissive Zellen die Blockade der späten Proteinsynthese überwunden wird und sich vorübergehend VP1 in diesen Zellen nachweisen ließ, obwohl die DNA nicht repliziert wird. Abb. 25 zeigt zwei SV676 T-Antigen exprimierende Zellen und zum Vergleich eine Wildtyp und SV40(cT)-3 T-Antigen exprimierende Zelle. SV40(cT)-3 hat einen ähnlichen Phänotyp wie SV676. Im allgemeinen zeigt SV40(cT)-3 eine etwas stärkere zytoplasmatische Anfärbung, während bei SV676 das T-Antigen

Abb. 24: Subzelluläre Lokalisierung

Diese Abbildung zeigt die subzelluläre Lokalisierung der T-Antigene von WT, SV676 und SV677 und des Hüllproteins VP1 in TC7 Zellen bei 300facher Vergrößerung. Die T-Antigene wurden mit dem monoklonalen Antikörper Pab416, VP1 mit dem monoklonalen Antikörper Pab597 nachgewiesen. Die Anfärbung erfolgte mit Hilfe eines mit Meerettich-Peroxidase gekoppelten anti-Maus Antikörpers.

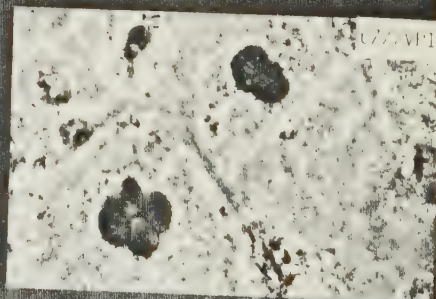
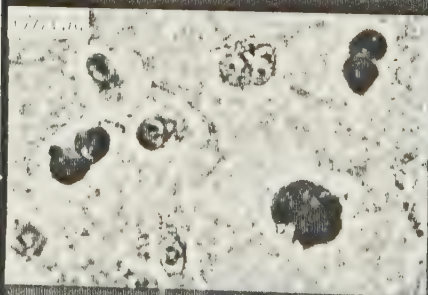
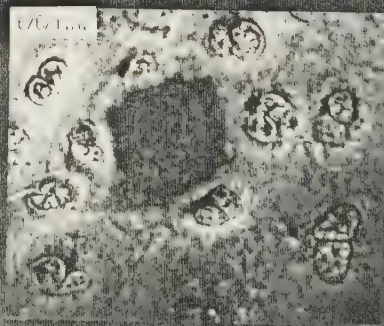
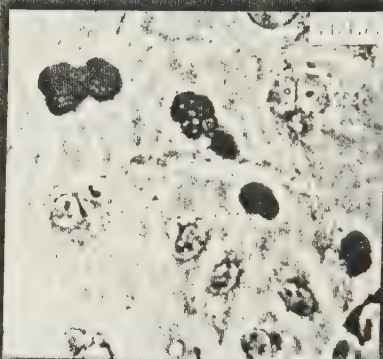
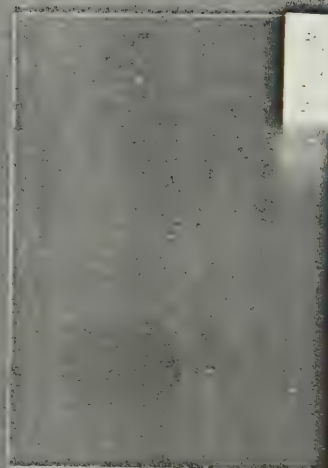
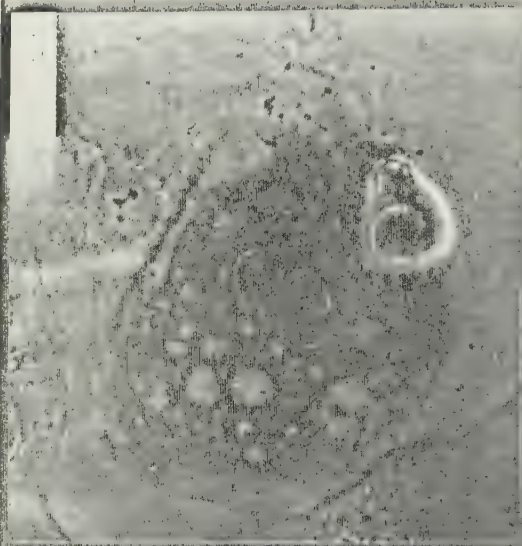


Abb. 25: Subzelluläre Lokalisierung

Hier wird die subzelluläre Lokalisierung des T-Antigens von SV676 bei 400facher Vergrößerung gezeigt. Als Vergleich wird der Phänotyp von WT T-Antigen und der Mutante SV40(cT)-3 (Lanford und Butel, 1984) gezeigt. Die Anfärbung erfolgte mit Pab419 wie in Abb. 24 beschrieben.

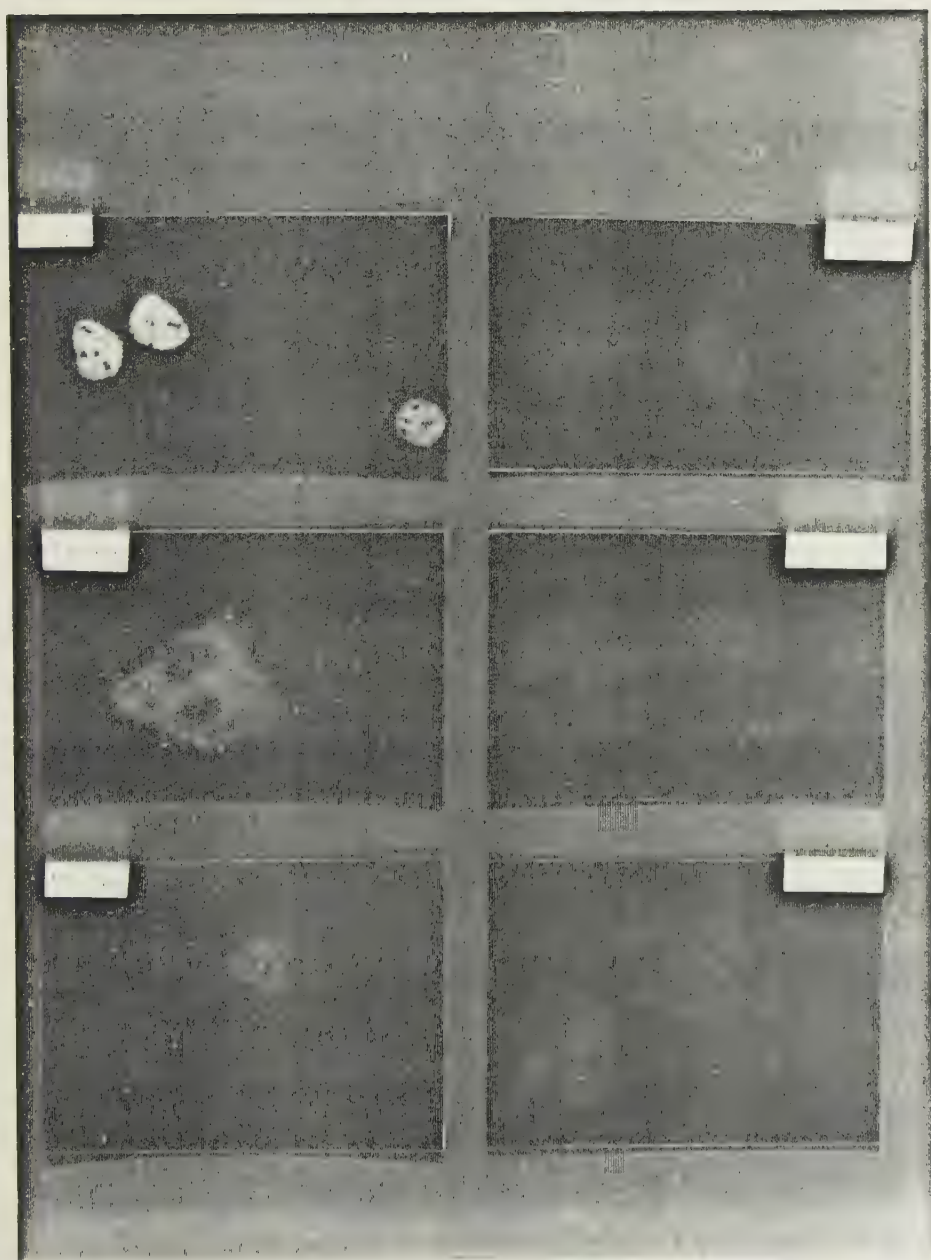


gleichmäßig in der Zelle oder etwas mehr im Zellkern lokalisiert ist.

Da die Mutation von SV676 das T-Antigen betraf und nicht VPl, legte dieser Befund die Vermutung nahe, daß die Anwesenheit des mutierten T-Antigens 676 den Kerntransport nicht nur von VPl, sondern auch anderer Proteine beeinflussen könnte, da VPl normalerweise im Kern lokalisiert ist. Diese Beobachtung warf die Frage auf, ob hier eine spezifische Wechselwirkung zwischen SV676 T-Antigen und VPl vorlag, oder ob diese T-Antigen Mutante auch die Lokalisierung anderer, natürlicherweise im Kern lokalisierter Proteine beeinflußt wird. Um diese Fragestellung nach einem Transeffekt dieser T-Antigen Mutante auf andere Proteine beantworten zu können, wurden diese Mutante exprimierende TC7 Zellen wie beschrieben 2 Tage nach DNA Transfektion mit Adenovirus2 infiziert und die Lokalisierung des durch diesen Virus kodierten Fiber Proteins und des T-Antigens in der gleichen Zelle untersucht. Das Fiber Protein wurde mit einem Anti-Fiber Serum aus Kaninchen und dem rot fluoreszierenden Farbstoff Texas Red, das T-Antigen mit dem monoklonalen Antikörper Pab 419 und dem gelb-grün fluoreszierenden Farbstoff Fluoresceinisothiocyanat wie beschrieben in derselben Zelle nachgewiesen (Abb. 26). Das Fiber Protein zeigte ebenso wie das SV676 T-Antigen eine gleichmäßige Verteilung im Kern und im Zytoplasma. Die subzelluläre Lokalisierung des Fiber Proteins wurde auch in Anwesenheit von WT T-Antigen und der zytoplasmatischen Mutante SV40(cT)-3 (Lanford und Butel, 1984) untersucht. Sowohl in Anwesenheit von WT T-Antigen als auch von SV40(cT)-3 akkumulierte das Adenovirus2 Fiber Protein ausschließlich im Zellkern. Ebenso ist VPl in Anwesenheit von SV40(cT)-3 T-Antigen im Kern lokalisiert (Daten nicht gezeigt). Aus diesen Beobachtungen kann man schließen, daß SV676 einen Transeffekt auf andere, möglicherweise alle, im Zellkern lokalisierte Proteine ausübt und daß der Grund für die ungewöhnliche Lokalisierung

Abb. 26: Subzelluläre Lokalisierung

Die subzelluläre Lokalisierung verschiedener T-Antigene und des Adenovirus Typ2 Fiber Proteins in derselben TC7 Zelle wird bei 300facher Vergrößerung gezeigt. Die T-Antigene wurden mit dem monoklonalen Antikörper Pab419, das Fiber Protein mit einem anti-Fiber Serum aus Kaninchen nachgewiesen. Die Anfärbung der T-Antigene erfolgte mit einem mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) gekoppelten anti-Maus Antikörper (gelb-grün), die des Fiber Proteins mit einem mit Texas Red gekoppelten anti-Kaninchen Antikörper (rot).

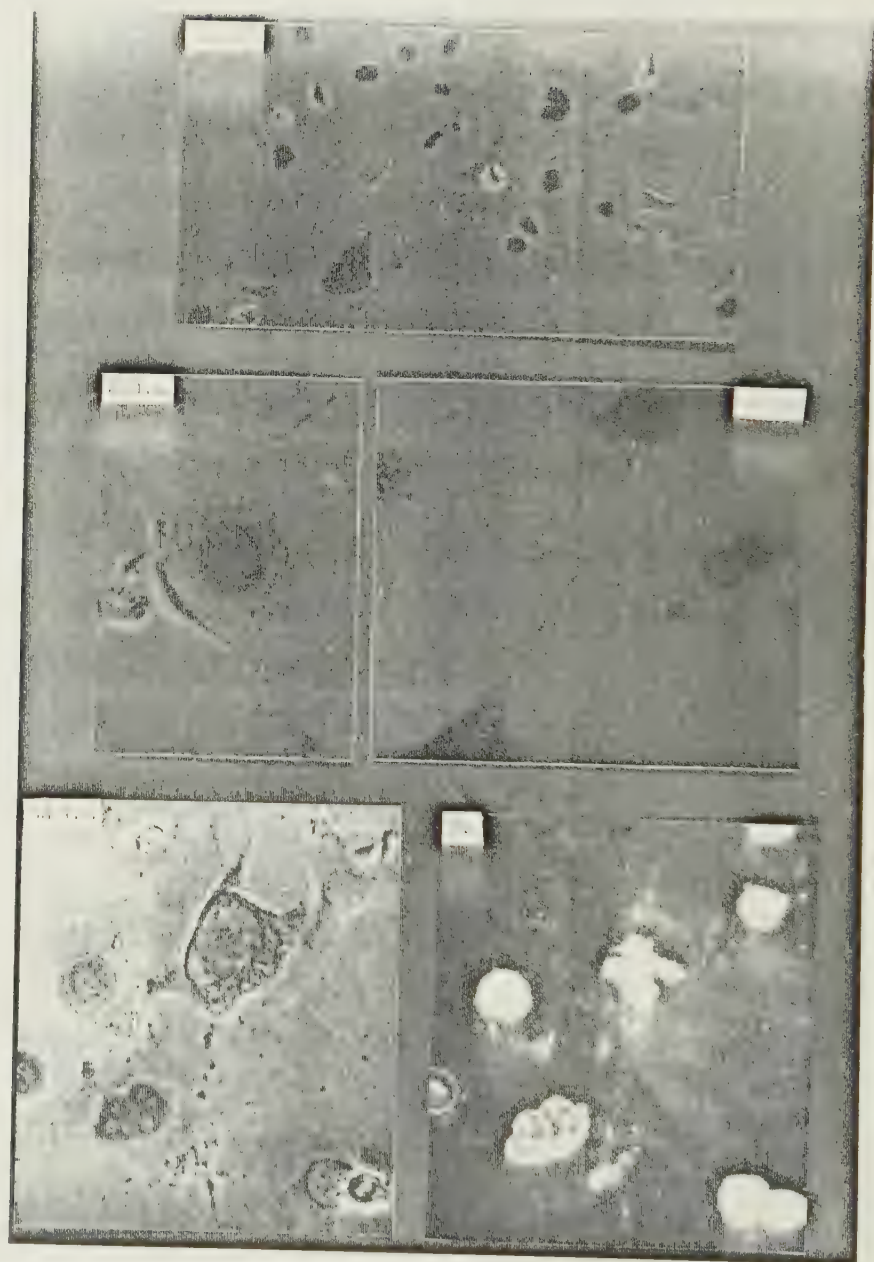


andere Ursachen haben sollte als die des Phänotyps von SV40(cT)-3. Da die Mutante SV676 in TC7 Zellen sehr schwach exprimiert ist und keine transformierte rat2 Zelllinie etabliert werden konnte, stand keine ausreichende Menge an Protein für weitere biochemische und biologische Untersuchungen zur Verfügung. TC7 Zellen, die SV676 exprimieren, zeigen starke morphologische Veränderungen (Abb. 25). Das Vorhandensein von vielen und großen Vakuolen und die Beobachtung, nach etwa 4-5 Tagen kein SV676 T-Antigen in TC7 Zellen mehr nachweisen zu können, deutet darauf hin, daß die Anwesenheit dieser T-Antigen Mutante für die Zelle lethal ist. Diese Beobachtungen könnten auch den Replikationsdefekt von SV676 in COS1 Zellen erklären. Ist nämlich das SV676 T-Antigen transdominant über das WT T-Antigen in COS1 Zellen, müßten Zellen, die mit SV676 erfolgreich transfiziert wurden und diese Mutante exprimieren, sterben.

Bei diesen Untersuchungen fiel auf, daß Wildtyp T-Antigen in TC7 Zellen doch nicht ausschließlich im Kern lokalisiert ist. Etwa 2% der T-Antigen exprimierenden Zellen zeigen eine gleichmäßige Verteilung des Proteins im Kern und Zytoplasma. Durch gleichzeitige Anfärbung von DNA und T-Antigen in derselben Zelle wurde gezeigt, daß in diesen Zellen das Chromatin kondensiert ist (Abb. 27). Die Zelle befindet sich in einem vermutlich abnormalen Teilungsstadium. Die beiden übrigen Photos auf dieser Abbildung zeigen T-Antigen exprimierende TC7 Zellen vermutlich zu Beginn und Ende der Mitose. Zu Beginn der Mitose, mit Auflösung der Kernmembran, diffundiert das T-Antigen in das Zytoplasma, während in den zwei zusammenhängenden Zellen, die sich gerade geteilt haben, das T-Antigen noch über die gesamte Zelle verteilt ist. SV676 T-Antigen exprimierende Zellen befinden sich in der Interphase, was durch Anfärbung der DNA gezeigt werden konnte. Das Chromatin ist in diesen Zellen gleichmäßig im Zellkern verteilt (Ergebnisse nicht gezeigt).

Abb. 27: Subzelluläre Lokalisierung

Es wird die subzelluläre Lokalisierung von WT T-Antigen in verschiedenen TC7 Zellen gezeigt. Das obere Photo zeigt verschiedene WT T-Antigen exprimierende Zellen bei 160facher Vergrößerung. Die beiden mittleren Photos zeigen WT T-Antigen exprimierende Zellen bei 300 facher Vergrößerung. Die beiden unteren Photos zeigen die Anfärbung von WT T-Antigenen und der DNA in denselben Zellen bei 300facher Vergrößerung. Die Anfärbung der T-Antigene erfolgte mit Pab419 wie in Abb. 24 beschrieben. Die DNA wurde mit Hoechst Farbstoff (Bisbenzimid H33258) angefärbt.



MUTANT	DNA REPLICATION	ORIGIN		FOCI RAT 2	LOCALISATION		PO ₄ IN WT
		DNA BINDING			T	VP1	
		I	II				
106	WT	+	+	+	N	N	N
111/112	<WT	+	+	+	N	N	C
120	-	+	+	+	N	N	-
123	-	+	+	+	N	N	N
124	-	+	-	+	N	N	C
124D	<WT	N.D.	N.D.	-	N	N	-
124E	<WT	+	-	+	N	N	-
124S	-	N.D.	N.D.	-	N	N	-
639	-	N.D.	N.D.	-?	N	-	N
676	-	N.D.	N.D.	-?	N/C	N/C	N
677	>WT	+	+	+	N	N	N
679	>WT	+	+	+	N	N	N
701	WT	+	+	+	N	N	C

N.D. = NOT DONE

N = NUCLEUS

C = CYTOPLASM

Tabelle 5: Zusammenfassung der biologischen und biochemischen Untersuchungen an den SV40 T-Antigen Mutanten

Die in dieser Arbeit besprochenen Phänotypen der einzelnen Mutanten sind in dieser Tabelle zusammengefaßt. Die letzte Spalte beschreibt, ob die jeweilige Aminosäure in vivo im Zellkern, oder im Zytoplasma phosphoryliert wird (Scheidtmann et al., 1984b).

5. Diskussion

5.1. T-Antigene mit Mutationen in den phosphorylierten Domänen

Diese Arbeit beschäftigte sich mit biochemischen und biologischen Untersuchungen an SV40 T-Antigen Mutanten, in denen jeweils eine bestimmte phosphorylierte durch eine nicht phosphorylierbare Aminosäure ersetzt wurde (Abb. 6).

Die Oligonukleotid gesteuerte Mutagenese wurde dazu benutzt, einzelne Triplets im T-Antigen Gen gezielt so zu verändern, daß diese nun für die gewünschte substituierte Aminosäure kodieren und gleichzeitig eine neu eingeführte Restriktionsenzym Erkennungsstelle enthielten, um die Mutation mit einer einfachen Restriktionsfragmentierung schnell verifizieren zu können. Alle Mutanten zeigten das erwartete Restriktionsschnittmuster. Bei der anschließenden Sequenzierung der Mutanten wurden mit Ausnahme von SV124D und SV124S die Mutationen an der erwarteten Position im T-Antigen Gen nachgewiesen. In einem angrenzenden Bereich von etwa 200 Basen konnte keine zusätzliche Mutation festgestellt werden. Eine Überraschung ergab sich bei der Sequenzierung der Mutanten SV124D und SV124S. Die vorausgesagten Nukleotidaustausche waren an der erwarteten Position nicht zu finden. Die erwarteten Mutationen wurden bei beiden Mutanten in 3'-Richtung verschoben gefunden (Abb. 11, 12). Beide Mutanten enthielten eine Duplikation, die an der gleichen Stelle in das SV40 Genom integriert war. Die Nukleotidaustausche wurden am 3'-Ende des Inserts gefunden. Diese Beobachtung ist so erstaunlicher, wenn man bedenkt, daß die Mutagenese Reaktion von SV124D und SV124E in demselben Reaktionsgefäß durchgeführt wurde, da ein Gemisch von Oligonukleotiden eingesetzt wurde (Seite 9). SV124E enthielt die erwartete Sequenz und SV124D eine Duplikation. Die Sequenzdaten sprechen dafür, daß das Oligonukleotid nicht an einer falschen Sequenz hybridisiert haben kann.

Dafür spricht die Nähe der Mutation von der erwarteten Position und die Tatsache, daß überhaupt keine Sequenzhomologien mit der Wildtypsequenz in 3'-Richtung von der Sequenz, wo die erwartete Hybridisierung des Oligonukleotids stattfinden sollte, festzustellen sind. Beide Mutanten zeigen genau die erwartete Sequenz im Bereich der Mutation, aber 53 bzw. 61 Basen in 3'-Richtung verschoben. Ein Modell, dieses Phänomen zu erklären, könnte folgendermaßen aussehen (Abb. 28, Schritt 1-5): Bei der Mutagenese Reaktion (Abb. 4) stoppt die Auffüllreaktion nicht wie erwartet am 5'-Ende des Oligonukleotids, sondern setzt sich fort und füllt den Wildtyp Einzelstrang weiter bis zu einem bestimmten Punkt auf (Schritt 1-2). Dieses wäre möglich, wenn das 5' Ende des Oligonukleotids vom Einzelstrang wegklappt, so daß der Polymerase weiterhin Einzelstrang DNA zur Verfügung steht. Dieses dürfte allerdings nur bis zu einem bestimmten Punkt geschehen. Nun müßte die hervorstehende einzelsträngige DNA, die am 5'-Ende die Oligonukleotid Sequenz enthält, mit dem "zu weit" aufgefüllten 3'-Ende durch die im Reaktionsgefäß vorhandene Ligase ligiert werden (Schritt 3). Die Einzelstrang DNA unterhalb der dadurch hervorstehenden Schleife müßte brechen, die kurzen entstandenen einzelsträngigen Bereiche aufgefüllt und ligiert werden (Schritt 4-5). Auf diese Weise würde man eine Duplikation bekommen, die am 3'-Ende die erwarteten Nukleotidaustausche trägt. Eine andere Möglichkeit wäre, daß Schritt 3 dadurch zustande kommt, daß das 5'-Ende des Oligonukleotids nicht unterlaufen, sondern bis zu einem bestimmten Punkt weggedrückt wird, bis die Spannung der dadurch entstehenden Schleife zu groß wird, was zum gleichen Resultat führen würde. Eine Alternative zu Schritt 4 könnte sein, daß die DNA unter der Schleife nicht bricht, sondern daß durch Replikation entweder die Mutante mit der Mutation am 3'-Ende der Duplikation oder ein Wildtypmolekül entsteht, was mit Hilfe der Koloniehybridisierung unterschieden werden konnte. Dieses

Erklärungsmodell ist reine Spekulation. Auch könnte die Qualität der Klenow Polymerase eine Rolle spielen. Ebenso ist fraglich, ob das Weglassen des Reinigungsschritts über den alkalischen Sucrosegradienten sinnvoll ist.

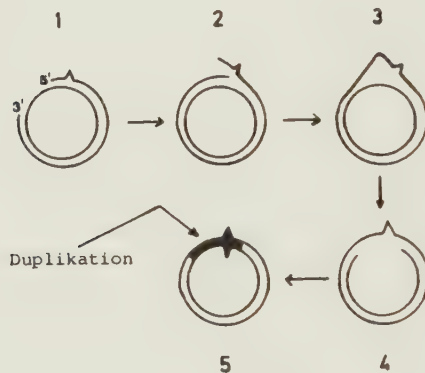


Abb. 28: Modell für die Entstehung der Duplikationen

Ähnliche Betrachtungen wurden von T. Werner (Doktorarbeit an der Universität München, 1986) gemacht, der bei einer von ihm dargestellten Adenovirus Typ2 Mutante ebenfalls eine Duplikation, aber zusätzlich noch eine Deletion und Inversion bestimmter Sequenzen beobachtete. Die Mutagenese Reaktion scheint also nicht ganz trivial zu sein, so daß man sich nicht alleine auf die Koloniehybridisierung und Restriktionskartierung beim Finden der Mutante verlassen sollte, sondern die gewünschte Mutation durch Sequenzierung sofort verifizieren sollte.

5.2. Biologische- und biochemische Charakterisierung

Im Ergebnisteil wurden die biologischen- und biochemischen Eigenschaften der T-Antigen Mutanten für die verschiedenen angewandten Tests beschrieben. Es wurde eine Vielzahl verschiedener Phänotypen beobachtet, die Tabelle 5 zusammengefaßt sind.

Das Replikationsverhalten der Mutanten war sehr unterschiedlich. Es wurden replikationsnegative, defekte und sogar eine Mutante, SV679, isoliert, die besser als Wildtyp repliziert. Kalderon und Smith (1984) stellten Punkt- und Deletionsmutanten her, die die N-terminale Phosphorylierungsdomäne einschließen und untersuchten sie auf ihre Replikations- und Transformationseigenschaften. Ein Vergleich mit diesen Daten ist schwierig, wenn nicht unmöglich, da ihre Aminosäureaustausche willkürlich waren und drastisch veränderte Substitutionen trugen. Feststellen läßt sich lediglich, daß bei Kalderon und Smith Austausch, die den Bereich der Aminosäure 106 bis 112 betrafen, geringen Einfluß auf die Replikationseigenschaften hatten, während Mutationen im Bereich 120 bis 124 meist replikationsnegativ waren. Hier kann man von einer Übereinstimmung mit meinen Daten reden. Mit einem Marker Rescue Experiment konnte gezeigt werden, daß der Replikationsdefekt der Mutanten SV 120, 123 und 124 ausschließlich auf der vorgenommenen Aminosäuresubstitution beruht und nicht auf unerwünschte phänotypische Sekundärmutationen zurückzuführen ist. An Position 124 reicht anscheinend eine negative Ladung aus, die Replikation zu initiieren (SV124E). Die Fähigkeit von SV124D zu replizieren, trotz der Verschiebung des Leserasters ab der Aminosäure 139, könnte eventuell damit erklärt werden, daß durch eine noch nicht entdeckte Deletion von einem Basenpaar in 3'-Richtung das ursprüngliche Leseraster wieder hergestellt wird. Auch könnte nach DNA Transfektion die

duplizierte Sequenz durch Rekombinationsprozesse in der Zelle wieder herausgeschnitten werden. Die Wahrscheinlichkeit hierfür ist allerdings erheblich geringer als für die erste Möglichkeit.

Die C-terminalen Aminosäuren des T-Antigens werden für die Replikationsfähigkeit nicht benötigt. Die Deletionsmutante dl 2459, in der die 35 C-terminalen Aminosäuren deletiert sind (Tornow et al., 1985), repliziert WT ähnlich, d.h. die Aminosäuren 677, 679 und 701 sind für die Replikation nicht essentiell. Dieses stimmt mit meinen Beobachtungen überein. Die Replikationsdefizienz von SV676 könnte an der ungewöhnlichen subzellulären Lokalisierung dieser Mutante liegen (s. Ergebnisse S. 72). Der Grund für die Überreplikation von SV679 ist ungeklärt. Dieses Phänomen steht in eventuellem Zusammenhang mit den deutlich veränderten DNA Bindungsverhalten an den SV40 Replikationsursprungsort (s. Ergebnisse, S. 63). Es bedarf weiterer Versuche, diese Erscheinung zu klären.

Die Deletionsmutante dl 2459 ist nicht in der Lage, in TC7 Zellen Viruspartikel auszubilden. Die deletierte C-terminale Domäne ist für die Stimulation der späten Proteinsynthese, die sogenannte Adenovirus-Helferfunktion notwendig (Fey et al., 1979; s. Einleitung). Diese Eigenschaft kann durch andere Deletionsmutanten komplementiert werden (Tornow et al., 1985). Diese Beobachtungen werden durch Mutanten von Pipas et al. (1983) bestätigt. Da die replizierenden Mutanten SV677, 679 und 701 Viruspartikel bilden, ist die Phosphorylierung dieser einzelnen Aminosäuren keine notwendige Voraussetzung für die Stimulation der späten Proteinsynthese.

Beim Betrachten des Transformationsverhaltens der Mutanten fiel auf, daß mit Ausnahme von SV124S und SV124D Mutationen im N-terminalen Phosphorylierungscluster keinen Einfluß auf die Transformationseigenschaften hatten. Bisher isolierte

Mutationen im Bereich der N-terminalen Phosphorylierungsdomäne haben im allgemeinen keinen oder nur geringen Einfluß auf die Transformationseigenschaft (Ausnahme: Glu 107 ---> Lys; Kalderon et al., 1984). Diese Beobachtungen korrelieren mit den in dieser Arbeit beschriebenen. Der Transformationsdefekt von SV124D und SV124S könnte mit der veränderten Aminosäuresequenz und einer damit verbundenen Instabilität erklärt werden.

Replikationsnegative transformationspositive SV40 Mutanten wurden bereits beschrieben (Manos und Gluzman, 1985; Peden und Pipas, 1985; Rutila et al., 1986). Replikation und Transformation stehen also in keinem direkten Zusammenhang. Es gibt Evidenzen, daß der C-Terminus von SV40 T-Antigen an der Etablierung und Aufrechterhaltung der Transformation beteiligt ist. Dieser Teil des Proteins, etwa 19% des C-Terminus, enthält keine Homologien zum großen T-Antigen des verwandten Polyomavirus (Tooze, 1981). Bei Polyoma ist das große T-Antigen nur für die Initiation der Transformation, nicht aber für die Aufrechterhaltung des Transformations- Status notwendig. Hierfür ist das mittlere Polyoma mT-Antigen ausreichend (Carmichael et al., 1982). Kleine Deletionen im C-Terminus des SV40 T-Antigens bewirken ein deutlich reduziertes Transformationsverhalten (Polvino-Bodnar und Cole, 1982). Mit Ausnahme der extrem C-terminalen Mutante SV701 zeigen SV639, 676, 677 und 679 gegenüber WT deutlich reduzierte Foci-Bildung. Mit SV639 und SV676 konnten keine transformierten rat2 Linien erhalten werden. Im Falle von SV676 könnte dies mit der ungewöhnlichen subzellulären Lokalisierung erklärt werden, die für die Zelle lethal sein könnte. Ob nun das Entfernen einer bestimmten Phosphatgruppe, oder die Art des Aminosäureaustausches der Grund für den Transformationsdefekt der C-terminalen Mutanten ist, kann nicht mit Sicherheit beantwortet werden. Riefe eine . veränderte Domänenstruktur im C-Terminus den Transformationsdefekt hervor, müßte man eine Beteiligung von

einer oder mehrerer C-terminaler Domänen am Transformationsvorgang postulieren. Wenn das nicht der Fall ist, sollte der Defekt durch den Wegfall der negativ geladenen Phosphatgruppe hervorgerufen werden. Vielleicht spielen aber auch beide Punkte eine Rolle.

Die von B. Jameson nach einem modifizierten Computerprogramm (Jameson und Wolf, 1986) nach Chou und Fasman (1978) vorgenommenen Voraussagen über die Sekundärstruktur der mutierten Antigene im Bereich der Mutation (s. Anhang, S. 97) besagen, daß mit Ausnahme von SV639 alle übrigen Mutationen im C-Terminus keinen Einfluß auf die Sekundärstruktur haben. Diese Beobachtung würde die Spekulation über einen Zusammenhang von Phosphorylierung im C-Terminus und Transformationsfähigkeit gegenüber einer durch Änderung der Domänenstruktur hervorgerufenen Defekt favorisieren. Es muß allerdings darauf hingewiesen werden, daß Computervoraussagen über Proteinstrukturen ohne röntgenkristallographische Daten in keiner Weise verifizierbar sind, so daß diese Betrachtung reine Spekulation ist. Die Übereinstimmung mit bekannten Daten ist jedoch im allgemeinen größer gleich 70%.

K.H. Scheidtmann, Freiburg (pers. Mitteilung) untersuchte die Phosphorylierung der in dieser Arbeit besprochenen transformierten N-terminalen rat2 Zelllinien. Diese Linien zeigten mit einer Ausnahme bis auf die substituierte Aminosäure ein normales Phosphorylierungsmuster, die Domänenstruktur im Bereich der Mutation sollte sich also nicht geändert haben, da benachbarte Aminosäuren normal phosphoryliert sind, also durch Kinasen weiterhin erkannt werden. In der mit SV124 transformierten Zelllinie gibt es einen phosphorylierten Threoninrest in dem Alanin 124 enthaltenen Peptid. Hier könnte das Threonin 117 phosphoryliert sein. Ebenso hat die Phosphorylierung im N-Terminus keinen Einfluß auf die im C-Terminus. Der umgekehrte Fall muß noch untersucht werden.

Die Frage nach dem DNA Bindungsverhalten ergab sich aus der positionellen Nähe der N-terminalen Phosphorylierungsdomäne und der Domäne des T-Antigens, die spezifisch an den SV40 Replikationsursprungsort bindet (s. Einleitung). Bindung und die Fähigkeit zur Initiation der DNA Replikation stehen in direktem Zusammenhang (Shortle et al., 1979). Allein die Fähigkeit des T-Antigens spezifisch an den Replikationsursprungsort zu binden reicht nicht aus, die Replikation zu initiieren. Vieles spricht dafür, daß weitere, andere Domänen betreffende, Funktionen des T-Antigens, wie z.B. ATPase Aktivität für die Replikation benötigt werden (Clark et al., 1983). Zwischen ATPase positiven, bindungsdefekten bzw. ATPase negativen, bindungspositiven Mutanten kann keine Komplementierung beobachtet werden (Tornow et al., 1985). Neuere Arbeiten zeigen, daß T-Antigen eine Helikase Aktivität besitzt, die ebenfalls bei der Replikation eine große Rolle spielen sollte (Stahl et al., 1986).

Bei Untersuchungen des Bindungsverhaltens der in dieser Arbeit besprochenen T-Antigen Mutanten wurde festgestellt, daß Mutationen im N-Terminus das Bindungsverhalten kaum beeinflussen. Alle N-terminalen Mutanten binden spezifisch an Bindungsstelle I, wobei bezogen auf die Menge gebundener DNA kein Unterschied zum WT festzustellen ist. A. Arthur (pers. Mitteilung) expremierte ein, die ersten 272 Aminosäuren des T-Antigens enthaltendes, bakterielles Hybridprotein in E.coli, das wahrscheinlich unphosphoryliert ist. Dieses Protein bindet spezifisch an Bindungsstelle I, was meine Ergebnisse bestätigt. Betrachtet man die Bindungsstelle II, fällt auf, daß mit Ausnahme von SV124 und SV124E die übrigen N-terminalen Mutanten Bindungsstelle II spezifisch binden. Mutanten mit Deletionen im C-Terminus, z.B. dll055, dll058 und dll061, binden spezifisch an den SV40 Replikationsursprungsort (Clark et al., 1983). Die Unterdrückung der frühen viralen Transkription, d.h. die Autoregulation, ist aber bei diesen Mutanten gestört. Die

Arbeit von Clark et al. unterscheidet nicht zwischen dem Bindungsverhalten an Stelle I und II. Es gibt andere Evidenzen, daß allein Bindung an Stelle I nicht genügt, um die frühe Transkription zu reprimieren (Myers et al., 1981a). Die C-terminalen Mutanten SV677 und SV679 zeigen ein gegenüber Wildtyp völlig verändertes Bindungsverhalten. SV677 bindet spezifisch an Bindungsstelle I und II, gegenüber WT aber erheblich schwächer an Bindungsstelle I. Bindung an Stelle II ist Wildtyp ähnlich. SV679 hingegen bindet Stelle I WT ähnlich, aber drastisch, gegenüber Wildtyp, mehr Bindungsstelle II enthaltende DNA. SV701 unterscheidet sich nicht vom Wildtyp. Diese Beobachtungen legen die Vermutung nahe, daß dieser Teil des Proteins eine Domäne repräsentiert, die eine bestimmte regulatorische Funktion auf das Bindungsverhalten ausübt. Nicht auszuschließen ist ein möglicher räumlicher Kontakt zwischen der N-terminalen Bindungsdomäne und einem Teil des C-Terminus, der diesen regulatorischen Effekt bewirken könnte. Vielleicht zeigen SV677 und 679 auch ein verändertes Oligomerisierungs- und damit Bindungsverhalten (Fanning et al., 1981; Scheidtmann et al., 1984). Arbeiten von Brent und Ptashne (1985) zeigten anhand eines Transkriptionsaktivators aus *S.Cerevisiae*, Gal4, daß ein regulatorisches Zusammenwirken von N- und C-Terminus möglich ist. Dieses Protein kann in eine N- und C-terminale Domäne unterteilt werden. Die N-terminale Domäne bindet spezifisch an DNA und steuert den Kerntransport, während die C-terminale Domäne die Oligomerisierung des Proteins ermöglicht und die Transkription des der Bindungsstelle benachbarten Gens aktiviert.

Der letzte Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit der subzellulären Lokalisierung des T-Antigen. Die Mutante SV676 zeigte einen interessanten Phänotyp. T-Antigen dieser Mutanten war zu etwa gleichen Teilen im Kern und Zytoplasma lokalisiert. Es konnte gezeigt werden, daß der Kerntransport zumindest von Vp1 und des Adenovirus Typ2 Fiber Proteins in

Zellen, die SV676 T-Antigen exprimieren beeinträchtigt ist, wahrscheinlich aber auch anderer Proteine. Der Defekt im Kerntransport anderer, im Kern benötigter, Proteine müßte zwangsläufig zum Tod der Zelle führen. Versuche, SV676 T-Antigen nach Mikroinjektion von SV676 DNA in rat2 Zellen nachzuweisen, schlugen fehl (R.Krieg, pers. Mitteilung). Dieses würde den Transformationsdefekt von SV676 erklären. Bei gleichem Phänotyp in rat2 Zellen sollte das Protein auch für diese Zellen lethal sein. Bassford et al. (1979) zeigten, daß die Veränderung der subzellulären Lokalisierung eines bestimmten Proteins in E.coli zum Zelltod führen kann. Sie stellten verschiedene Hybridproteine her, die am N-Terminus einen Teil des periplasmatischen Maltose Bindungsproteins aus E.coli trugen, während der C-Terminus sich aus enzymatisch aktiver beta-Galaktosidase zusammensetzte. Keines dieser Hybridproteine wurde in das Periplasma transportiert. Ein Teil der Hybridproteine wurde in der zytoplasmatischen Membran gefunden. Dadurch wurde der Transport auch anderer periplasmatischer Proteine beeinflusst. Vorläufer dieser Proteine akkumulierten im Zytoplasma und die Zelle starb.

Der Grund für den Phänotyp von SV676 ist ungeklärt. Vielleicht liegt diese Mutation in einer zweiten möglichen Kerntransport Signalsequenz. Richardson et al. (1986) zeigten, daß Polyoma zwei verschiedene Signalsequenzen besitzt, die zum Kerntransport beitragen. Schickedanz et al. (1986) zeigten, daß SV40(cT)-3 schneller als WT T-Antigen oligomerisiert und vermuteten, daß eventuell nur Monomere die Poren der Kernmembran passieren könnten. Da Phosphorylierung und Oligomerisierung in Zusammenhang stehen, könnte sich bei SV676 vielleicht das Oligomerisierungsverhalten geändert haben. Auf Grund des Trans-Effektes auf andere natürlicherweise im Kern vorkommende Proteine könnte man aber auch vermuten, daß SV676 ein allgemeines Transportsystem, daß eventuell alle Proteine in den Zellkern transportiert, blockiert.

Vielleicht spielt eine bestimmte posttranslationale Modifizierung für den Kerntransport eine Rolle (SriSharma et al., 1985), die sich bei SV676 entweder an der Position 676 oder an einer anderen geändert haben könnte. Dieser Effekt könnte durch Änderung dieser, oder durch Beeinflussung anderer Domänen hervorgerufen sein. Newmeyer et al. (1986) zeigten, daß ATP für die Akkumulation von Nukleoplasmin im Kern benötigt wird. Vieles spricht dafür, daß Kerntransport und Akkumulation im Kern ein Zusammenwirken mehrerer Prozesse notwendig macht.

Die Beobachtung, daß Wildtyp T-Antigen bei sich im Mitosestadium befindlichen Zellen in der gesamten Zelle lokalisiert war, wirft die Frage auf, ob zwischen Oligomerisierung und Kerntransport tatsächlich ein Zusammenhang besteht, da nach einer Zellteilung T-Antigen ausschließlich im Kern beobachtet wird und ein großer Teil der Moleküle vor der Mitose als Oligomere vorliegen. Möglich wäre, daß die Wechselwirkung von T-Antigen mit bestimmten zellulären Strukturen, wie dem Chromatin und der Kernmatrix während der Mitose erhalten bleibt und daß nach der Mitose das T-Antigen selbst gar nicht aktiv transportiert werden muß. Auch könnte sich Oligomerisierungs- und Phosphorylierungsstatus während der Mitose ändern, um auf diese Weise den Kerntransport auch älterer Moleküle zu regulieren. Diese Hypothesen sind rein spekulativ und müssen wesentlich genauer untersucht werden.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß einige Punkte für eine Wechselwirkung zwischen einer N- und C-terminalen Domäne des T-Antigens sprechen. Die virale DNA Bindungsdomäne wurde wie besprochen im N-Terminus lokalisiert. In ihrer Nähe wurde auch zumindest eine Sequenz, die für den Kerntransport des Proteins notwendig ist, entdeckt. Auf beide Eigenschaften hatten Mutationen in der C-terminalen Phosphorylierungsdomäne Einfluß. B. Vogt (Dissertation, Universität München, 1986) zeigte, daß die

spezifische DNA Bindung des T-Antigens an die Bindungsstellen I und II durch Zugabe von niedrigen Konzentrationen an ATP (und anderer Analoga) stark inhibiert wird, obwohl die ATP Bindungsstelle weiter im C-Terminus vermutet wird (Aminosäure 272-537).

6. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden SV40 T-Antigen Mutanten erzeugt, deren Mutationen die N- und C-terminale Phosphorylierungsdomäne betrafen. Es wurden alle bisher bekannten phosphorylierten Serin- und Threoninreste durch nicht phosphorylierbare Aminosäuren ersetzt. Die Mutationen wurden mit Hilfe von Restriktionsenzym Fragmentierung und anschließender Sequenzierung verifiziert. Zwei Mutanten enthielten eine Duplikation im Bereich der Mutation.

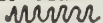
Die T-Antigen Mutanten wurden auf folgende biologischen- und biochemischen Eigenschaften untersucht:

1. Initiation der DNA Replikation in permissiven Affenzellen.
2. Transformation von nicht permissiven Rattenzellen.
3. Spezifische Bindung an den SV40 Replikationsursprungsort.
4. Subzelluläre Lokalisierung in permissiven TC7 Affenzellen.

Es wurden eine Vielzahl verschiedener Phänotypen beobachtet. Es wurde gezeigt, daß Mutationen im C-Terminus das DNA Bindungsverhalten beeinflussen, obwohl die virale DNA Bindungsdomäne im N-Terminus lokalisiert worden ist. Eine C-terminale Mutante zeigte eine ungewöhnliche subzelluläre Lokalisierung und beeinflußte den Kerntransport anderer Proteine, trotzdem sich zumindest eine lokalisierte Signalsequenz für den Kerntransport im N-Terminus befindet, die der viralen Bindungsdomäne nahe ist. Es besteht also ein möglicher Kontakt zwischen der C-terminalen Phosphorylierungsdomäne und der viralen DNA Bindungsdomäne.

Die Vielzahl der Phänotypen zeigt, daß die phosphorylierten Domänen des Proteins für seine biologischen- und biochemischen Funktionen wichtig sind. Ob diese Phänotypen ausschließlich durch den Wegfall bestimmter Phosphatgruppen an genau definierten Aminosäuren hervorgerufen wurden, kann jedoch nicht mit Sicherheit beantwortet werden.

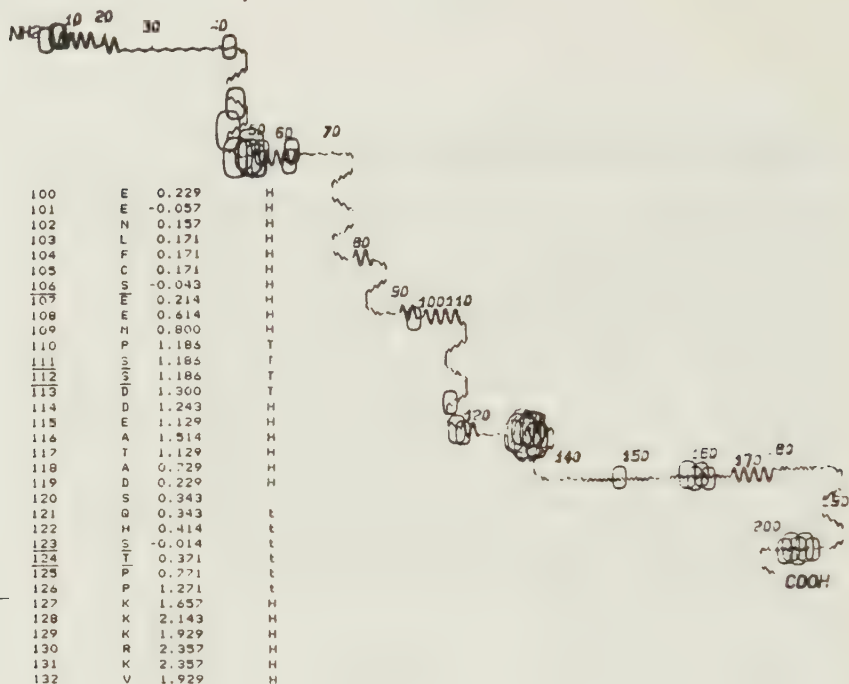
7. Anhang: Voraussagen über die Sekundärstruktur der T-Antigen Mutanten nach Chou und Fasman (1979)

Von Herrn Dr. B. Jameson wurden Computervoraussagen über die Sekundärstrukturen der T-Antigen Mutanten im Bereich der Mutation angefertigt. Die durchgezogenen Linien mit den angeschriebenen Zahlen stellt die Aminosäurekette dar mit Bereichen, die eine hohe Wahrscheinlichkeit für eine bestimmte Sekundärstruktur haben (alpha Helix , beta Faltblatt  und Haarnadelbiegung ). Die Einrahmung der Kette mit $\square$ diesem Symbol bedeutet, daß dieser Bereich stark hydrophil ist, $\square$ bedeutet stark hydrophob. Die nebenstehenden Zahlen und Buchstaben bedeuten von rechts nach links gelesen folgendes: Aminosäureposition, Aminosäure (Austausch unterstrichen), Maß für die Hydrophilität >0 bzw. Hydrophobität <0 und die wahrscheinliche Sekundärstruktur, wobei ein Großbuchstabe eine größere Wahrscheinlichkeit als ein klein geschriebener Buchstabe ausdrückt: H, h= alpha Helix; B, b= beta Faltblatt; T, t= Haarnadelbiegung. Als Beispiel wird eine Sequenz, die die C-terminalen phosphorylierten Aminosäuren (unterstrichen) enthält, gezeigt.

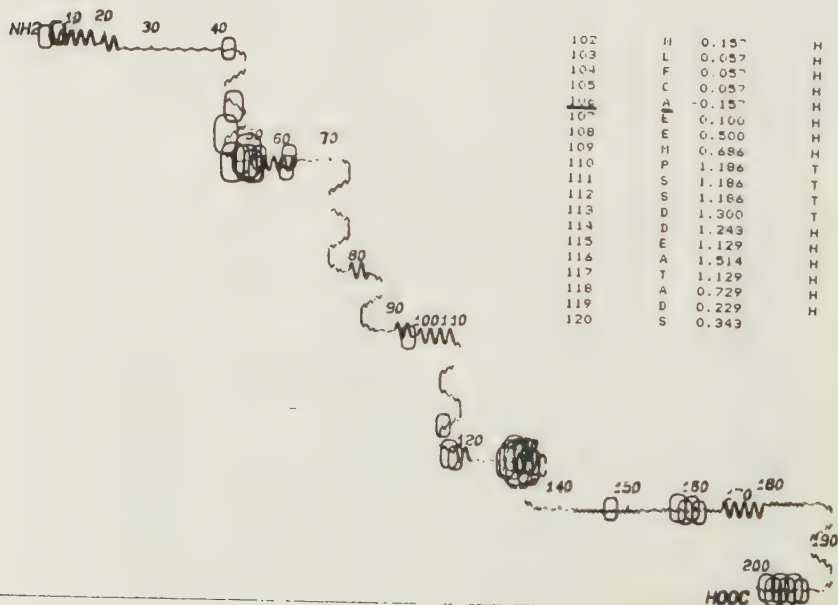
623	I	-0.986		672	Q	-0.329	
624	G	-0.486		673	A	-0.286	
625	V	-0.786	B	674	P	-0.286	
626	L	-1.043	B	675	Q	0.100	
627	D	-0.357	B	<u>676</u>	<u>S</u>	0.114	t
628	W	-0.329	B	<u>677</u>	<u>S</u>	-0.029	t
629	L	-0.071	B	678	Q	-0.100	t
630	P	0.614	t	679	S	0.300	t
631	H	0.614	t	<u>680</u>	<u>V</u>	0.186	
632	S	1.529	h	681	H	0.171	
633	D	2.214	h	682	D	0.171	t
634	D	2.214	h	683	H	0.129	t
635	D	2.614	h	684	N	0.014	t
636	D	2.614	h	685	Q	0.014	
637	E	2.214	h	686	F	-0.671	B
638	S	2.214	h	687	I	-0.743	B
<u>639</u>	<u>S</u>	1.814	h	688	H	-0.343	B
640	O	1.314	h	689	I	-0.371	B
641	E	1.314	h	690	C	-0.729	B
642	N	1.314	h	691	R	-0.457	B
643	A	1.300	h	692	G	-0.529	B
644	D	1.700	h	693	F	-0.629	B
645	K	1.700	h	694	T	-0.057	B
646	H	1.671	h	695	C	-0.057	B
647	E	1.743	h	696	F	-0.057	B
648	D	1.743	h	697	K	0.300	
649	G	1.743	T	698	K	0.300	
650	G	1.743	T	699	P	0.443	
651	E	1.129	H	700	P	0.800	t
652	K	1.129	H	<u>701</u>	<u>T</u>	0.371	t
653	H	1.557	H	<u>702</u>	<u>P</u>	0.371	
654	N	1.600	H	703	P	0.371	
655	E	1.171	H	704	P	0.800	T
656	D	0.671	H	705	E	0.800	T
657	S	1.071	H	706	P	0.933	
658	G	1.200		707	E	1.120	
				708	T	1.400	

sv40lgt.pep (WT)

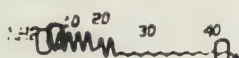
90



sv106

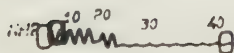


sv111.112



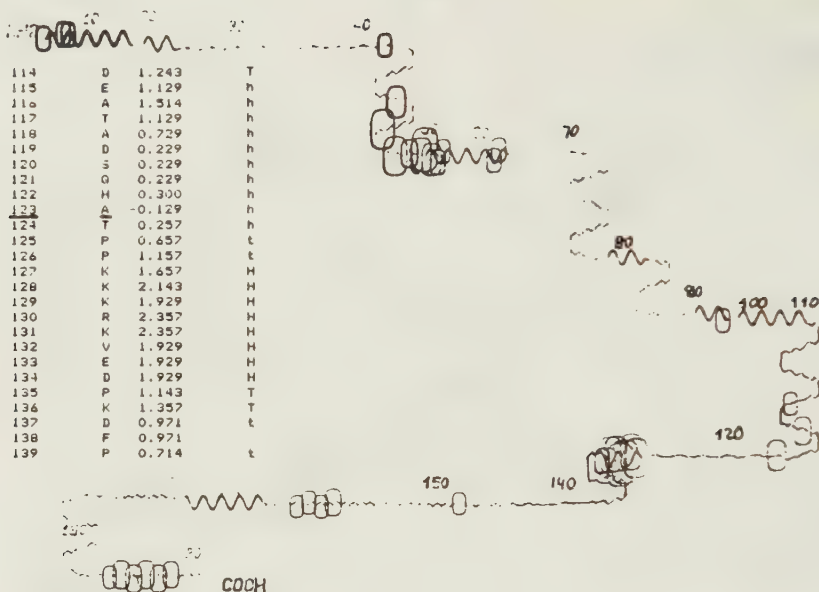
102	N	0.157	H
103	L	0.171	H
104	F	0.171	H
105	C	0.171	H
106	S	-0.043	H
107	E	0.214	H
108	E	0.500	H
109	H	0.500	H
110	P	0.886	
111	A	0.886	
112	C	0.886	
113	D	1.000	T
114	D	0.943	T
115	E	0.743	
116	A	1.514	
117	T	1.129	
118	A	0.729	t
119	D	0.229	t
120	S	0.343	t
121	G	0.343	t
122	H	0.414	t
123	S	-0.014	t
124	T	0.371	t
125	V	0.771	t
126	P	1.271	t
127	K	1.657	H

sv120.

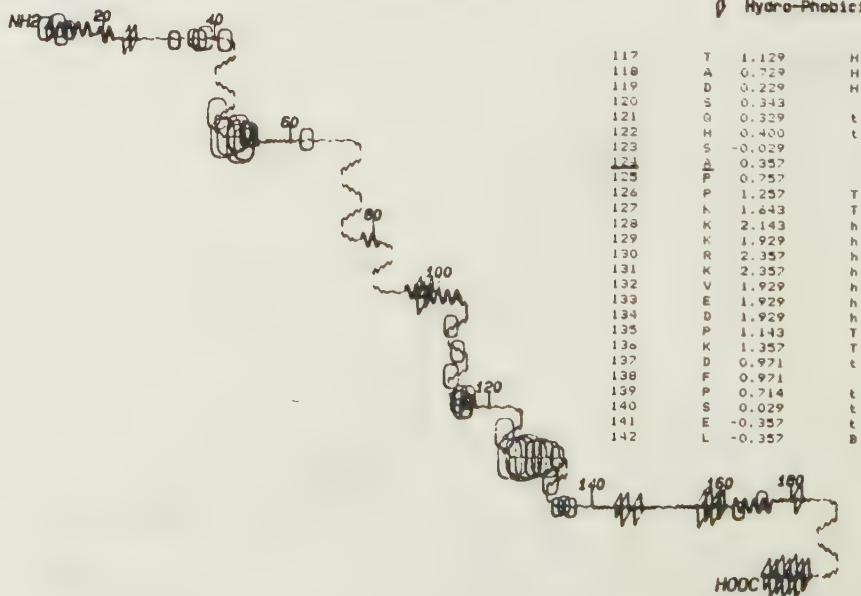


sv123.

92



sv124a.

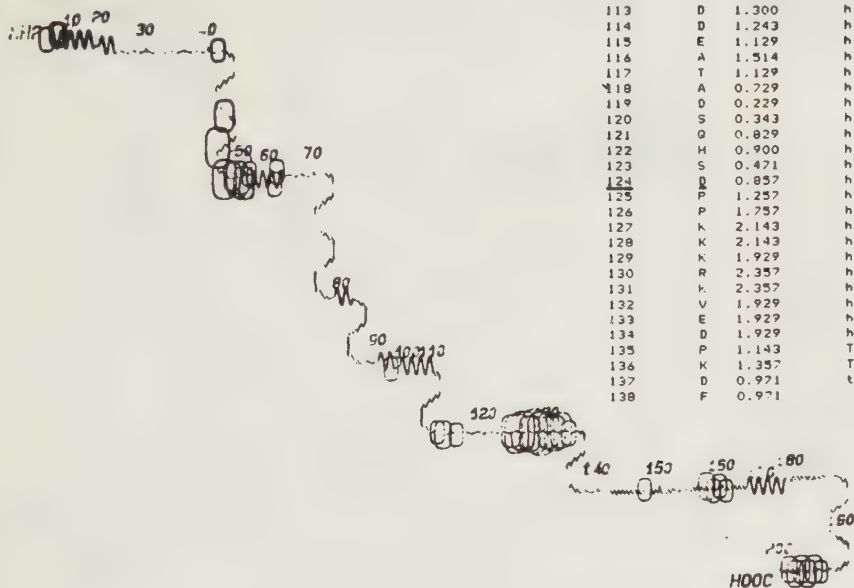
Chou-Fasman prediction
13-DEC-85 12:30
☐ Hydro-Philicity >=0
☒ Hydro-Phobicity


117	T	1.129	H
118	A	0.729	H
119	D	0.229	H
120	S	0.343	
121	G	0.329	t
122	H	0.400	t
123	S	-0.029	
124	A	0.357	
125	P	0.757	
126	P	1.257	T
127	K	1.643	T
128	K	2.143	h
129	K	1.929	h
130	R	2.357	h
131	K	2.357	h
132	V	1.929	h
133	E	1.929	h
134	D	1.929	h
135	P	1.143	T
136	K	1.357	t
137	D	0.971	t
138	F	0.971	t
139	P	0.714	t
140	S	0.029	t
141	E	-0.357	t
142	L	-0.357	B

sv124D.

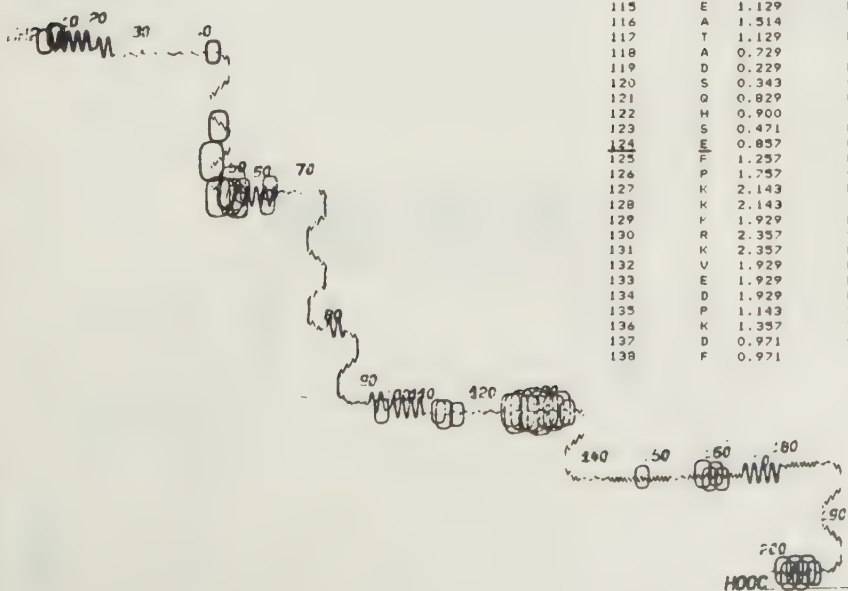
93

111	S	1.184	T
112	S	1.184	h
113	D	1.300	h
114	D	1.243	h
115	E	1.129	h
116	A	1.514	h
117	T	1.129	h
118	A	0.729	h
119	D	0.229	h
120	S	0.343	h
121	Q	0.829	h
122	H	0.900	h
123	S	0.471	h
124	D	0.857	h
125	P	1.257	h
126	P	1.757	h
127	K	2.143	h
128	K	2.143	h
129	K	1.929	h
130	R	2.357	h
131	K	2.357	h
132	V	1.929	h
133	E	1.929	h
134	D	1.929	h
135	P	1.143	T
136	K	1.357	T
137	D	0.971	t
138	F	0.971	



sv124e.

114	D	1.243	h
115	E	1.129	h
116	A	1.514	h
117	T	1.129	h
118	A	0.729	h
119	D	0.229	h
120	S	0.343	h
121	Q	0.829	h
122	H	0.900	h
123	S	0.471	h
124	E	0.857	h
125	F	1.257	h
126	P	1.757	h
127	K	2.143	h
128	K	2.143	h
129	P	1.929	h
130	R	2.357	h
131	K	2.357	h
132	V	1.929	h
133	E	1.929	h
134	D	1.929	h
135	P	1.143	T
136	K	1.357	T
137	D	0.971	t
138	F	0.971	





118	A	0.729	H
119	D	0.229	H
120	S	0.343	
121	Q	0.443	
122	H	0.514	t
123	S	0.086	
124	S	0.471	T
125	P	0.871	t
126	P	1.371	t
127	K	1.757	
128	K	2.143	H
129	K	1.929	H
130	R	2.357	H
131	K	2.357	H
132	V	1.929	H
133	E	1.929	H
134	D	1.929	H
135	P	1.143	T
136	K	1.357	
137	D	0.971	t
138	F	0.971	

N#CC1=CC=C(C=C1)C(=O)NCC2=CC=CC=C2

540

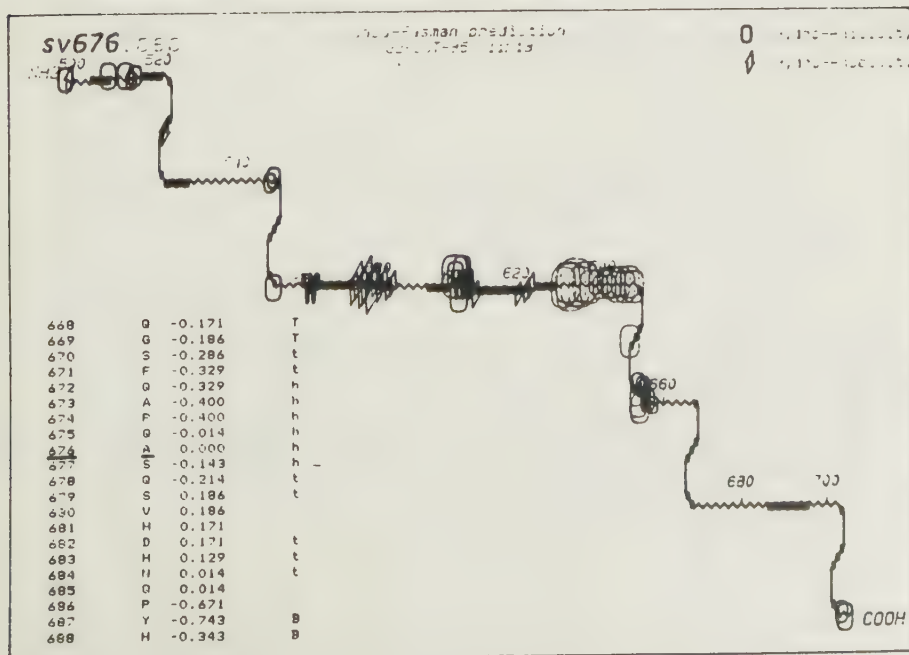
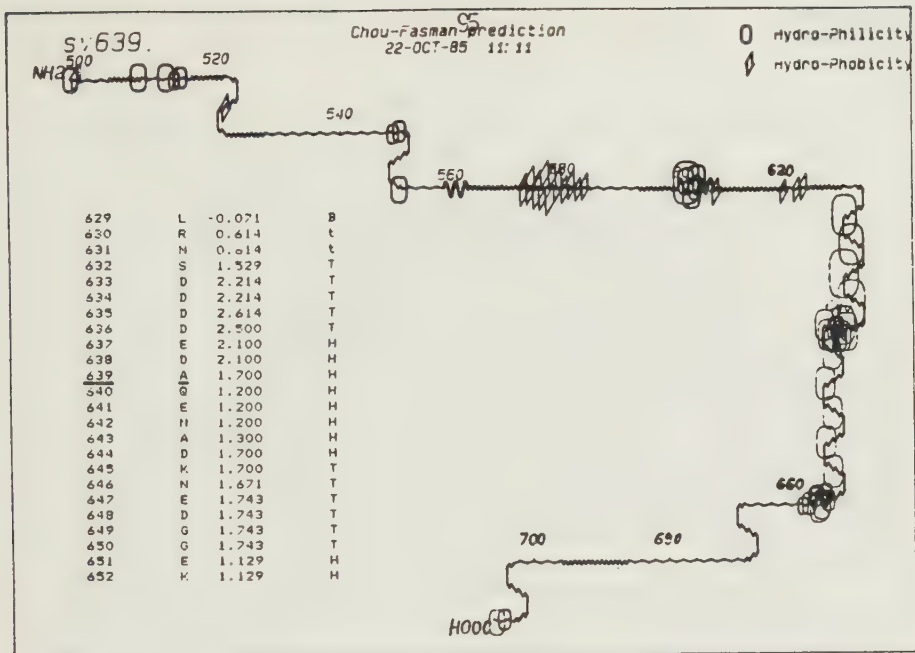
52

660

580

703

 COOH



SV679
500 510 520
NH₂

530 540 550

560 570 580 590 600 610 620 630 640

674	P	-0.286	
675	O	0.100	t
676	S	0.000	t
677	S	-0.143	t
678	G	-0.214	h
679	A	0.186	h
680	V	0.071	h
681	H	0.057	h
682	D	0.057	h
683	H	0.129	h
684	N	0.014	
685	G	0.014	
686	P	-0.671	
687	Y	-0.743	B
688	H	-0.343	B
689	I	-0.371	B

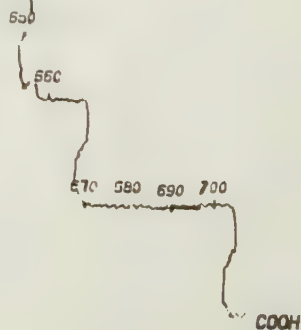


SV701
500 510 520
NH₂

530 540 550

560 570 580 590 600 610 620 630 640

694	T	-0.057	B
695	C	-0.057	B
696	F	-0.057	B
697	K	0.300	
698	K	0.286	
699	P	0.429	
700	P	0.786	
701	A	0.357	
702	P	0.357	
703	P	0.357	
704	P	0.786	T
705	E	0.800	T
706	P	0.933	
707	E	1.120	
708	I	1.400	



8. Literatur

Bassford Jr., P.J., Silhavy, T.J. and Beckwith, J.R. (1979). Use of gene fusion to study secretion of maltose binding protein into *E.coli* periplasm. *J. Bacteriol.* 139: 19-31.

Brady, J., Bolen, J., Radonovich, M., Salzman, N. und Khoury, G. (1984). Stimulation of simian virus 40 late gene expression by simian virus 40 tumor antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81: 2040-2044.

Brady, J. und Khoury, G. (1985). Trans activation of the simian virus 40 late transcription unit by T antigen. *Mol. Cell Biol.* 5: 1391-1399.

Brent, R. and Ptashne, M. (1985). A eukaryotic transcriptional activator bearing the DNA specificity for a prokaryotic repressor. *Cell* 43: 729-736.

Burke, B. and Gerace, L. (1986). A cell free system to study reassembly of the nuclear envelope at the end of mitosis. *Cell* 44: 639-652.

Butel, J.S., Guentzel, M.J. and Rapp, F. (1969). Variants of defective simian papovavirus 40 (para) characterized by cytoplasmic localisation of simian papovavirus tumorantigen. *J. Virol.* 4: 632-641.

Carmichael, G., Schaffhausen, B., Dorsky, D. and Benjamin, T. (1982). Carboxy terminus of polyoma middle-sized tumor antigen is required for attachment to membranes, associated protein kinase activities, and cell transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79: 3579-3583.

Carroll, R.B. and Gurney, E.G. (1982). Time-dependent maturation of the simian virus 40 large T antigen-p53 complex studied by using monoclonal antibodies. *J. Virol.* 44: 565-573.

Carter, P., Bedouelle, H. and Winter, G. (1985). Improved oligonukleotide site-directed mutagenesis using M13 vectors. *Nucleic Acids Res.* 13: 4431-4442.

Chen, E.J. and Seeborg, P.H. (1985). Supercoil sequencing: a fast and simple method for sequencing plasmid DNA. *DNA* 4: 165-170.

Chou, P.Y., Fasman, G. (1978). Prediction of secondary structure of proteins. *Adv. Enzymol.* 47: 145-147.

Clark, R., Peden, K., Pipas, J., Nathans, D. and Tjian, R. (1983). Biochemical activity of T antigen proteins encoded by SV40 A gene deletion mutants. *Mol. Cell Biol.* 3: 220-228.

Clayton, C.E., Murphy, D., Covett, M and Rigby P.W.J. (1982). A fragment of SV40 large T antigen transforms. *Nature* 299: 59-61.

Cohen, P. (1982). The role of protein phosphorylation in neural and hormonal control of cellular activity. *Nature* 296: 613-620.

Crowe, R., Ozer, H. and Fifkin, D. (1983). Experiments with normal and transformed cells. A laboratory manual for working with cells in culture. Cold Spring Harbour Laboratory, CHS, New York.

Dente, L., Caesareni, G. and Cortese, R. (1983). pEMBL: a new family of single-stranded plasmids. *Nucleic Acids Res.* 11: 1645-1655.

Deppert, W., Gurney, E.G and Henning, R. (1981). Simian virus 40 T antigen related cell surface antigen: serological demonstration on simian virus 40 transformed monolayer cells in situ. *J. Virol.* 35: 505-518.

Deppert, W. and Staufienbiel, M. (1985). Distinct domains of SV40 large T antigen mediate its association with different cellular targets. *Nucleic Acids Res.* 13: 5077-5091.

DeRobertis, E.M. (1983). Nucleocytoplasmatic segregation of Proteins and RNAs. *Cell* 32: 1021-1025.

DiMaio, D. and Nathans, D. (1980). Cold sensitive regulatory mutants of simian virus 40. *J. Mol. Biol.* 140: 129-142.

DiMaio, D. and Nathans, D. (1982). Regulatory mutants of simian virus 40. Effect of mutations at a T antigen binding site on DNA replication and expression of viral genes. *J. Mol. Biol.* 156: 531-548.

Dingwall, C. (1985). The accumulation of proteins in the nucleus. *TIBS* 10: 64-68.
 (Howard, C.A.F., Kimmy, G. and Hartley, G. (1984). ³⁵S-labeled T antigen and T antigen-related proteins in the nucleus of SV40-transformed cells. *J. Virol.* 52: 715-722.)
 Fanning, E., Nowak, B. and Burger, C. (1981). Detection and characterisation of multiple forms of simian virus 40 large T antigen. *J. Virol.* 37: 92-102.

Fanning, E., Westphal, K.H., Brauer, D. and Corlin, D. (1982). Subclasses of simian virus 40 large T antigen: differential binding of two subclasses of T antigen from

productively infected cells to viral and cellular DNA. EMBO J. 1: 1023-1028.

Fey, G., Lewis, J.B., Grodzicker, T. and Bothwell, A. (1979). Charakterisation of a fused protein specified by the Adenovirus type 2-simian virus 40 hybrid Ad2*ND1dp2. J. Virol. 30: 201-227.

Gergen, J.P., Stern, R.H. and Wensink, P.C. (1979). Filter replicas and permanent collections of recombinant DNA plasmids. Nucleic Acids Res. 7: 2115-2136.

Gluzman, Y. (1981). SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. Cell 23: 175-182

Graessmann A., Graessmann, M. and Mueller, C. (1976). Regulatory mechanism of simian virus 40 gene expression in permissive and non permissive cells. J. Virol. 17: 854-862.

Graham, F.L. and Van der Eb (1973). A new technique for the assay of infectivity of human Adenovirus5 DNA. Virology 52: 456-467.

Gurney, E.G., Tomorowsky, S. and Deppert, W. (1986). Antigenic binding sites specific for simian virus 40 large T antigen. J. Virol. im Druck.

Hanks, J.M. and Wallace, D.E. (1949). Relation of oxygen and temperatur in the preservation of tissue by refrigeration. Proc. Soc. Exp. Mol. Med. 71: 196.

Harlow, E., Crawford, L.V., Pim, D.C. and Williamson, N.M. (1981). Monoclonal antibodies specific for simian virus 40 tumor antigens. J. Virol. 39: 861-869.

Heinrich, P. (1986). Leitfaden zum einfachen und schnellen Plasmid-Sequenzieren. Firma Boehringer (Mannheim), im Druck.

Hinzpeter, M., Fanning, E. and Deppert, W. (1986). A new sensitiv target bound DNA binding essay for SV40 large T antigen. Virology 148: 159-167.

Hirt, B. (1967). Selectiv extraction of Polyoma DNA from infected mouse cell cultures. J. Mol. Biol. 26: 365-369.

Huber, B., Vakalopoulou, E., Burger, C. and Fanning, E. (1985). Identification and biochemical analysis of DNA replication defectiv large T antigens from SV40 transformed cells. Virology 146: 188-202.

Jameson, B.A. and Wolf, H. (1986). Prediction of two dimensional protein surface contour: a novel algorithm for the prediction of antigenic sites. Science eingereicht.

- Jones, K.A. and Tjian, R. (1984). Essentiell contact residues within SV40 large T antigen binding sites I and II identified by alkylation interference. *Cell* 36: 153-162.
- Kalderon, D., Richardson, W.D., Markham, A.F. and Smith, A.E. (1984). Sequence requirements for nuclear location of simian virus 40 large-T antigen. *Nature* 311: 33-38.
- Kalderon, D. and Smith, A.E. (1984). In vitro mutagenesis of a putative DNA binding domain of SV40 large-T. *Virology* 139: 109-137.
- Kessler, S.W. (1975). Rapid isolation of antigens from cells with a staphylococcal protein A-antibody absorbent: parameters of the interaction of antibody-antigen complexes with protein A. *J. Immunol.* 115: 1617-1624.
- Klockmann, U., Staufenbiel, M. and Deppert, W. (1984). Membrane interaction of SV40 large T antigen: influence of protein sequences and fatty acid acylation. *Mol. Cell. Biol.* 4: 1542-1550.
- Kramer, B., Kramer, W. and Fritz, H.J. (1984). Different base/base mismatches are corrected with different efficiencies by the methyl-directed DNA mismatch-repair system of *E. coli*. *Cell* 38: 879-887.
- Kunkel, T.A. (1985). Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82: 488-492.
- Laemmli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lanford, R. and Butel, J. (1984). Construction and characterisation of an SV40 mutant defective in nuclear transport of T antigen. *Cell* 37: 801-813.
- Luthman, H. and Magnusson, G. (1983). High efficiency polyoma DNA transfection of chloroquine treated cells. *Nucleic Acids Res.* 11: 1295-1308.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. (1982). Molecular Cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbour Laboratory. CSH, New York.
- Manos, M. and Gluzman Y. (1985). Genetic and biochemical analysis of transformation-competent, replication-defective simian virus 40 large T antigen mutants. *J. Virol.* 53: 120-127.
- McCutchan, J.H. and Pagano, J.S. (1968). Enhancement of the infectivity of simian virus 40 Deoxyribonucleic Acid with

Diethylaminoethyl-Dextran. J. Natl. Cancer Inst. 41: 351-357.

Miake-Lye, R. and Kirschner, M.W. (1985). Induction of early mitotic events in a cell free system. Cell 41: 165-175.

Morrison, B., Kress M., Khoury, G. and Jay, G. (1983). SV40 tumor antigen: isolation of the origin specific DNA binding domain. J. Virol. 47: 106-114.

Myers, R.M., Rio, D.C., Robbins, A.K. and Tjian, R. (1981a). SV40 gene expression is modulated by the cooperative binding of T antigen to DNA. Cell 25: 373-384.

Myers, R.M., Klogman, M. and Tjian, R. (1981b). Does simian virus 40 T antigen unwind DNA? J. Biol. Chem. 256: 10156-10160.

Newmeyer, D.D., Lucocq, J.M., Bürglin, T.R. and DeRobertis, E.M. (1986). Assembly in vitro of nuclei active in nuclear protein transport: ATP is required for nucleoplasmin accumulation. EMBO J. 5: 501-510.

Paucha, E., Kalderon, D., Richardson, W.D., Harvey, R.W. and Smith, A.E. (1985). The abnormal location of cytoplasmic SV40 large T antigen is not caused by failure to bind to DNA or to p53. EMBO J. in Druck

Peden, K.W.C. and Pipas, P. (1985). Site-directed mutagenesis of the simian virus 40 large T antigen gene: replication - defective amino acid substitution mutants that retain the ability to induce morphological transformation. J. Virol. 55: 1-9.

Pellicer, A., Robins, D., Wold, D., Sweet, B., Jackson, I., Lowry, I., Robert, J.M., Sim, G.K., Siverstein, S. and Axel, R. (1980). Altering genotype and phenotype by DNA mediated gene transfer. Science 209: 1414-1422.

Pipas, J. (1985). Mutations near the carboxyl terminus of the simian virus 40 large T antigen alter viral host range. J. Virol. 54: 569-575.

Pipas, J.M., Peden, K.W.C. and Nathans, D. (1983). Mutational analysis of simian virus 40 T antigen: isolation and characterisation of mutants with deletions in the T antigen gene. Mol. Cell. Biol. 3: 203-213.

Polvino-Bodnar, M. and Cole, C. (1982). Construction and characterisation of viable deletion mutants of simian virus 40 lacking sequences near the 3' end of the early region. J. Virol. 43: 489-502.

- Pope, J.H. and Rowe, W.P. (1964). Detection of specific antigen in SV40-transformed cells by immunofluorescence. *J. Exp. Med.* 120: 121-128.
- Prives C., Barnet, B., Scheller, A., Khoury, G. and Jay, G. (1982). Discrete regions of simian virus 40 large T antigen are required for non specific and viral origin-specific DNA binding. *J. Virol.* 43: 73-82.
- Reed, S., Ferguson, J., Davis, R. and Stark, G.R. (1975). T antigen binds to the simian virus 40 DNA at the origin of replication. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 72: 1605-1609.
- Richardson, W.D., Roberts, B. L. and Smith, A.E. (1986). Nuclear location signals in polyoma virus large T. *Cell* 44: 77-85.
- Rigby, P. and Lane, D.P. (1983). Structure and function of simian virus 40 large T antigen. *Advances in Viral Oncology* 3, Raven Press, New York.
- Robb, J.A. and Huebner, K. (1979). Effect of cell chromosome number on simian virus 40 replication. *Exp. Cell Res.* 81: 120-126.
- Rubin, C.S. and Rosen, O.M. (1975). Protein phosphorylation. *Annu. Rev. Biochem.* 44: 831-887.
- Rutla, J.E., Imperiale, M.J. and Brockman, W.W. (1986). Replication and transformation functions of in vitro generated simian virus 40 large T antigen mutants. *J. Virol.* 58: 526-535.
- Sanger, F., Nickler, S. and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74: 5463-5467.
- Scheidtmann, K.H., Hardung, M., Echle, B. and Walter, G. (1984a). DNA-binding activity of simian virus 40 large T antigen correlates with a distinct phosphorylation state. *J. Virol.* 50: 1-12.
- Scheidtmann, K.H., Schickedanz, J., Walter, G., Lanford, R.E. and Butel, J. (1984b). Differential phosphorylation of cytoplasmic and nuclear variants of simian virus 40 large T antigen encoded by simian virus 40- adenovirus 7 hybrid viruses. *J. Virol.* 50: 636-640.
- Schickedanz, J., Scheidtmann, K.H. and Walter, G. (1986). Kinetics of nuclear transport and oligomerisation of SV40 large T antigen. *Virology* 148: 47-57.
- Shortle, D.R., Margolskee, R.F. and Nathans, D. (1979). Mutational analysis of the simian virus 40 replicon:

pseudorevertants of mutants with a defective replication origin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76: 6128-6138.

Sleigh, M.J., Topp, W.C., Hanich, R. and Sambrook, J.F. (1978). Mutants of SV40 with an altered small t protein are reduced in their ability to transform cells. *Cell* 14: 79-88.

Smith, A.E., Kalderon, D., Roberts, D., Colledge, W.D., Edge, M., Gillet, P., Markham, A.F., Paucha, E. and Richardson, W.D. (1985). The nuclear location signal. *Proc. Royal Soc. Lond. B* 226: 43-58.

Smith, A.E., Smith, R. and Paucha, E. (1978). Extraction and fingerprint analysis of simian virus 40 large and small T antigen. *J. Virol.* 28: 140-153.

Somparac, L.M., Gurney, E.G. and Danna, K.J. (1983). Stabilisation of the 53,000-Dalton nonviral tumor antigen is not required for transformation by simian virus 40. *Mol. Cell Biol.* 3: 290-296.

Sothorn, E. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517.

SriSharma, Rodgers, L., Brandsma, J., Gething, M.J. and Sambrook, J. (1985). SV40 T antigen and the exocytic pathway. *EMBO J.* 4: 1479-1489.

Stahl, H., Dröge, P. and Knippers, R. (1986). DNA helicase activity of SV40 large tumor antigen. *EMBO J.* eingereicht.

Tegtmeyer, P. (1972). Simian virus 40 Deoxyribonucleic Acid synthesis: the viral replicon. *J. Virol.* 10: 591-598.

Tjian, R., Fey, G. and Graessmann, A. (1978). Biological activity of purified simian virus 40 T antigen proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75: 1279-1283.

Tjian, R. (1981). T antigen binding and the control of gene expression. *Cell* 26: 1-2.

Toozé, J. ed. (1980). *The Molecular Biology of Tumor Viruses*. Second ed. Cold Spring Harbor Laboratory; CSH, N.Y.

Topp, W.C. (1981). Normal rat cell lines deficient in nuclear thymidine kinase. *Virology* 113: 408-411.

Tornow, J., Polvino-Bodnar, M., Santangelo, G. and Cole, C.N. (1985). Two separable functional domains of simian virus 40 large T antigen: carboxyl-terminal region of simian virus 40 large T antigen is required for efficient capsid Protein synthesis. *J. Virol.* 53: 415-424.

Twigg, A. and Sherratt, D. (1980). Trans-complementable copy number mutants of plasmid Col El. *Nature* 281: 216-218.

Walseth, T.F. and Johnson, R.A. (1979). The enzymatic preparation of (γ -³²P)Nucleoside Triphosphates, cyclic (³²P)AMP, and (³²P)GMP. *Biochim. et Biophys. Acta* 526: 11-31.

Zoller, M.J. and Smith, M. (1982). Oligonucleotide directed mutagenesis using M13-derived vectors: an efficient and general procedure for the production of point mutations in any fragment of DNA. *Nucleic Acids Res.* 10: 6487-6500.

Lebenslauf

Name	Jens Schneider
Geburtsdatum	10. Juni 1956
Geburtsort	Bielefeld
Eltern	Dr. Eckart Schneider Roswitha Schneider, geb. Pohlmann
Familienstand	Ledig
1962-1966	Volksschule in Bielefeld
1966-1974	Max Planck Gymnasium in Bielefeld (mathematisch naturwissenschaftlich)
1974	Abitur
1975-1976	Chemiestudium an der Universität Clausthal-Zellerfeld
1976-1978	Chemiestudium an der Universität Bielefeld (1978 Vordiplom)
1978-1979	Chemiestudium and der Ludwig- Maximilians-Universität München
1979-1981	Chemiestudium an der Universität Bielefeld
07. 1981	Diplom-Hauptprüfung im 12. Semester
09.1981-05.1982	Diplomarbeit unter der Anleitung von Prof. Dr. A. Müller am Institut für anorganische Chemie der Universität Bielefeld. Thema: Präparative- sowie cyclo- voltametrische- und photoelektronen- spektroskopische Untersuchungen an an Chalkogeno-Metallato-Komplexen.
08.1982-02.1986	Doktorarbeit unter der Anleitung von Prof. Dr. E. Fanning am Institut für Biochemie der Ludwig-Maximilians- Universität München. Thema: Biologische- und biochemische Charakterisierung von SV40 T-Antigenen mit Mutationen in den phosphorylierten Domänen.

